COUNTWAY LIBRARY
HC 4VV6 F

BOSTON MEDICAL LIBRARY
PURCHASED FROM THE INCOME OF THE
SAMUEL WHEELER WYMAN
MEMORIAL FUND

3. 16. 89

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/einfuhrungindief0000drlm

# EINFÜHRUNG

IN DIE

# FARBSTOFFCHEMIE

## FÜR HISTOLOGEN

VON


**Dr. L. MICHAELIS**

ASSISTENZARZT AM STÄDTISCHEN KRANKENHAUSE GITSCHINERSTRASSE
IN BERLIN

**BERLIN 1902**
VERLAG VON S. KARGER
KARLSTRASSE 15.

BOSTON MEDICAL
SEP 28 1916
LIBRARY

13962 Hy. 75

Alle Rechte vorbehalten.

Druck von A. Hopfer in Burg b. M

SEINEN HOCHVEREHRTEN LEHRERN,

HERRN

GEHEIMRAT PROFESSOR DR. P. EHRLICH

UND

HERRN

PROFESSOR DR. M. LITTEN

IN DANKBARKEIT

GEWIDMET

VOM VERFASSER.

# Vorwort.

Das vorliegende Büchlein zerfällt in zwei Abschnitte, die reine und die auf die Histologie angewandte Farbstoffchemie.

Der erste Teil soll kein eigentliches Lehrbuch der Farbstoffchemie sein. Ein solches zu schreiben, fühlte ich mich nicht berufen. Es soll nur eine Einführung in die Chemie der organischen Farbstoffe sein und damit einem fühlbaren Mangel abhelfen. Für den Histologen besteht die Schwierigkeit, dass in den allgemeinen Lehrbüchern der Chemie zu wenig Rücksicht auf die Farbstoffchemie genommen wird, und dass die eigentlichen Lehrbücher der Farbstoffchemie zu viel Chemie voraussetzen. Diese Lücke soll der erste Teil ausfüllen. Man erwarte daher nicht eine auch nur annähernd vollständige Aufzählung aller der Farbstoffe, welche jemals in der Histologie angewandt worden sind, sondern nur eine Darstellung von Typen der einzelnen Klassen.

Der zweite Teil soll nicht eine vollständige Beschreibung der histologischen Färbemethoden sein, sondern er ist ein Versuch, der meist noch recht unwissenschaftlich betriebenen Methodik der Färbung eine wissenschaftlich-chemische Grundlage zu geben.

Die Absicht des Ganzen ist es, das Interesse für die chemische Bedeutung der Manipulationen zu erwecken, welche jeder histologisch und auch klinisch arbeitende Mediziner täglich auszuführen gewohnt ist. Ich wurde dabei von der Überzeugung geleitet, dass ein tieferes Eindringen in den Chemismus der Färbung die Erfindung neuer Färbemethoden unmittelbar zur Folge haben muss: nicht solcher Methoden, welche nur das in Blau wiedergeben, was wir gestern in Rot darzustellen gewohnt waren, sondern wirklich neuer, spezifischer Methoden.

Seit mehr als vier Jahren habe ich mich mit farbstoff-chemischen Fragen beschäftigt, das erste dieser Jahre unter der fruchtbaren Anregung des Herrn Geheimrat Prof. Dr. Ehrlich, meines hochverehrten Lehrers. Mehrere kleinere Arbeiten habe ich über diesen Gegenstand an anderen Stellen bereits publiziert, einige andere lege ich hiermit zum ersten Mal nieder.

Vor einem Jahre, als mein Manuskript bereits zu zwei Dritteilen fertig gestellt war, erschien der „Grundriss der Farbchemie“ von A. Pappenheim. Wenn ich mich trotz rückhaltloser Anerkennung dieses Werkes doch entschlossen habe, auch meine Arbeit zu Ende zu führen, so geschah das, weil ich sah, dass meine experimentellen Studien mich in manchen Punkten zu anderen Resultaten geführt hatten als Pappenheim. Infolge starker Inanspruchnahme mit klinischem Dienst wurde allerdings die Beendigung der Arbeit bis heute hinausgeschoben. Ich verdanke es dem weitgehenden Entgegenkommen meines Chefs, des Herrn Prof. Dr. Litten, dass mir die Zeit zur Vollendung dieser Arbeit zur Verfügung stand.

Berlin, im April 1902.

**L. Michaelis.**

# Inhaltsverzeichnis.


Seite

I. Allgemeine Chemie der Farbstoffe . . . . . 1
1. Der Begriff des Farbstoffes . . . . . 1
2. Der Zusammenhang der chemischen Constitution und der Eigenfarbe im Allgemeinen . . . . . 1
3. Der Zusammenhang zwischen der chemischen Constitution und der Art der Eigenfarbe . . . . . 11
4. Der Zusammenhang von gefärbtem Körper und Farbstoff . . . . 13
5. Allgemeine chemische Eigenschaften der Farbstoffe . . . . . 19
a) Reduktion und Verküpung . . . . . 19
b) Die Löslichkeitsverhältnisse der Farbstoffe und die mehrsäurigen und mehrbasischen Farbsalze . . . . . 21
c) Die Echtheit der Farben . . . . . 24
d) Die Fluorescenz . . . . . 25

II. Spezielle Chemie der Farbstoffe . . . . . 27
1. Die Nitrofarbstoffe . . . . . 27
2. Die Azofarbstoffe . . . . . 28
3. Die Farbstoffe nach dem Chinontypus . . . . . 38
a) Indamine und Indophenole . . . . . 38
b) Thiazine und Thiazone . . . . . 41
c) Oxazine und Oxazone . . . . . 46
d) Azine . . . . . 46
e) Azoniumbasen . . . . . 49
f) Diphenylmethanfarbstoffe . . . . . 52
g) Triphenylmethanfarbstoffe . . . . . 53
h) Chinolin- und Acridinfarbstoffe . . . . . 66
i) Oxychinone und Chinonoxime . . . . . 67
4. Einige unwichtigere, nicht nach dem Chinontypus gebaute Farbstoffe 71
5. Einige wichtige Farbstoffe unbekannter Constitution . . . . . 74

III. Theorie des Färbeprozesses . . . . . 78
1. Die substantive Färbung . . . . . 78
2. Die Beizenfärbung . . . . . 89

IV. Die vitale Färbung . . . . . 93
1. Die vitale Färbung zu physiologischen Zwecken . . . . . 95
2. Die vitale Färbung zu histologischen Zwecken . . . . . 98
3. Anhang: Die Färbung des abgestorbenen Gewebes . . . . . 109

V. Die Färbung des fixierten Objekts . . . . . 110
1. Das Verhalten der verschiedenen Farbstoffklassen gegenüber dem Gewebe . . . . . 111
a) Die einfachen (nicht vermischten) Farbstoffe . . . . . 111
1. Die sauren Farbstoffe . . . . . 111

Seite
2. Die basischen Farbstoffe . . . . . 115
3. Die Metachromasie . . . . . 116
4. Die neutralen Farbstoffe . . . . . 121
5. Die Beizenfarbstoffe . . . . . 124
6. Die indifferenten Farbstoffe . . . . . 125
b) Die Farbstoffcombinationen . . . . . 127
1. Die successive Färbung mit verschiedenen Farbstoffen . . . 127
2. Die Simultanfärbung mit Farbstoffgemischen . . . . . 129
α) Gemische chemisch gleichartiger Farbstoffe . . . . . 129
β) Gemische ungleichartiger Farbstoffe . . . . . 132
c) Die Entfärbung . . . . . 136
2. Das Verhalten der verschiedenen Gewebselemente zu den Farbstoffen 139
a) Die Färbung der Zellkerne . . . . . 139
b) Die Färbung der protoplasmatischen Substanzen . . . . . 144
c) Die Färbung des Fettes . . . . . 144
d) Die Färbung der Bindegewebssubstanzen . . . . . 145
e) Die Färbung der Kittsubstanzen etc. . . . . 145
f) Die Färbung der elastischen Fasern . . . . . 145
g) Die Färbung der Bakterien . . . . . 147
h) Die Färbung der Axencylinder der Nerven . . . . . 150
i) Die Färbung der Markscheiden . . . . . 150
k) Die Färbung der Neuroglia . . . . . 151
Historischer Überblick über die Entwickelung der Farbstoffchemie . . 153

BOSTON MEDICAL
SEP 28 1916
LIBRARY

# I. Allgemeine Chemie der Farbstoffe.

## 1. Der Begriff des Farbstoffes.

Der Begriff des Farbstoffes im chemischen Sinn deckt sich nicht ganz mit dem des gewöhnlichen Sprachgebrauchs. Gemeinhin pflegt man den Begriff weiter zu fassen als es der chemische Sprachgebrauch zulässt und versteht unter einem Farbstoff jeden Stoff, welchen man dazu benutzen kann, andere Körper zu färben, sei es nun, dass der zu färbende Körper den Farbstoff seiner Lösung spontan entreisst oder dass man eine Aufschwemmung eines gefärbten Stoffes auf die Oberfläche des zu färbenden Körpers aufträgt und antrocknen lässt. Der Chemiker versteht unter einem Farbstoff nur einen Stoff, welcher von dem zu färbenden Körper aus seiner Lösung angezogen wird, sei es direkt oder unter Vermittlung eines dritten Stoffes, den man dann als „Beize" bezeichnet.

Der Begriff des Farbstoffes im chemischen Sinn verlangt zwei Eigenschaften:

1. Die Eigenfarbe,

2. Die Fähigkeit, sich an andere, feste Körper aus seiner Lösung heraus zu binden.

Jede dieser beiden Eigenschaften hängt von der Struktur des Moleküls ab. Es ist daher unsere erste Aufgabe, den Zusammenhang der chemischen Constitution mit jeder dieser beiden Eigenschaften, Eigenfarbe und Färbevermögen, zu besprechen.

## 2. Der Zusammenhang der chemischen Constitution und der Eigenfarbe im Allgemeinen.

Es giebt auch unter den anorganischen Stoffen zahlreiche gefärbte. Nicht immer kann man in der chemischen Constitution derselben eine Ursache für die Färbung finden. Doch lassen sich einige Grundsätze immerhin aufstellen. Zunächst giebt es eine Reihe von Elementen, welcher der Mehrzahl ihrer Verbindungen eine Färbung erteilen. Ich möchte diese als „chromogene" Elemente bezeichnen. Diese bilden jedoch keine scharfe, von den anderen sicher abgrenzbare Gruppe; manche Elemente erteilen nur einigen ihrer Verbindungen

eine Färbung, z. B. das Jod. So ist Jodkalium ungefärbt, während Jodquecksilber stark gefärbt ist. Dagegen sind alle Verbindungen des Chrom, Kobalt, Nickel gefärbt.

Im elementaren Zustande haben von den Nicht-Metallen eine Färbung: Fluor, Chlor, Brom, Jod, Phosphor, Schwefel. Von den Metallen ist eine grössere Zahl gefärbt, unter anderen Chrom, Gold, Kupfer.

Viel mehr der Erforschung zugänglich sind die organischen Körper. Zunächst ist bei ihnen das grosse Heer der aliphatischen Körper aus der Zahl der gefärbten Körper so gut wie ganz auszuschliessen.[1]) Wenn einmal ein aliphatischer Körper eine stärkere Färbung zeigt, so liegt das fast immer an der Verbindung mit einem chromogenen Element, z. B. beim Kupferacetat, Berlinerblau (Ferriferrocyankalium).

Die erste Hauptbedingung für die Färbung eines organischen Körpers ist also, dass er der aromatischen Reihe angehört, oder mit anderen Worten, dass er mindestens einen Benzolkern enthält.

Die zweite Hauptbedingung ist das Vorhandensein eines bestimmten Atomenkomplexes, den man deshalb als **chromophore Gruppe** bezeichnet. Es giebt deren nur eine beschränkte Zahl. Es sind:

1. die Nitrogruppe, $NO_2$. Das Stickstoffatom derselben ist fünfwertig, die Gruppe hat daher noch eine Valenz frei. Die blosse Substitution eines Wasserstoffatoms im Benzol durch die Nitrogruppe ruft Gelbfärbung hervor (Nitrobenzol).

2. die Nitrosogruppe, $NO$, in welcher der Stickstoff dreiwertig auftritt. Diese Gruppe hat daher auch eine bindungsfähige Valenz frei.

3. die Azogruppe $-N=N-$, welche aus zwei doppelt gebundenen dreiwertigen Stickstoffatomen besteht, von denen jedes eine Valenz frei hat. Diese beiden freien Valenzen müssen an je einen Benzolring gebunden sein. Befindet sich nur auf der einen Seite der Azogruppe ein Benzolring, auf der anderen irgend eine andere Gruppe, so bezeichnet man $N=N$ nicht mehr als Azogruppe, sondern als Diazogruppe. Also

$$\diagdown\!\!-N=N-$$

Azobenzol,

aber:

$$\left(\ \diagdown\ \right)\!\!-N=N-Cl$$

Diazobenzolchlorid.

[1]) Die Ausnahmen von dieser Regel haben schon deshalb für uns nur geringes Interesse, weil die gefärbten aliphatischen Verbindungen niemals Mutter-substanzen eigentlicher Farbstoffe sind.

Als „Diazobenzol“ schlechtweg bezeichnet man diejenige Diazoverbindung, bei welcher an das zweite $N$ die Hydroxylgruppe $OH$ gebunden ist:

$$-N=N-OH$$

Diazobenzol.

Nur in Form der Azogruppe hat $N=N$ die Eigenschaft einer chromophoren Gruppe; die Diazokörper sind dagegen ungefärbt und im trockenen Zustand ausserdem sehr explosiv.

4. die Gruppe $C=C$, sobald das eine der beiden Kohlenstoffatome ein Glied eines Benzolringes ist.

5. die Gruppe $C=N$, sobald das $C$-Atom ein Glied eines Benzolringes ist.[1])

6. die Gruppe $C=O$ (Carbonyl), sobald das $C$ ein Glied eines Benzolringes ist.[2]) [3])

7. die Azingruppe,

[1]) Oder auch eines Fünferringes (Thiazolfarbstoffe).

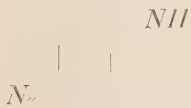
[2]) Oder auch eines Fünferringes (Indigoblau).

[3]) Von manchen Autoren pflegt als Chromophor z. B. des Farbstoffes

die Gruppe

und als Chromophor des Farbstoffes

die Gruppe

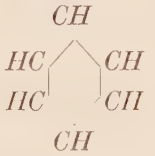


Ich habe das Gemeinsame der Chromophore, das $N=C$, herausgegriffen und damit die Zahl der chromophoren Gruppen beschränkt. Dasselbe gilt von den Gruppen $C=C$ und $C=O$.

welche sich von der Azogruppe nur durch eine andere Lagerung der Bindungen unterscheidet.[1])

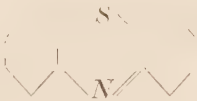
Diese Gruppen scheinen auf den ersten Blick ohne inneren Zusammenhang zu sein. Aber bei näherer Betrachtung zeigt sich doch, zunächst wenigstens für einen Teil von ihnen, eine eigentümliche Ähnlichkeit. Zunächst muss es auffallen, dass die Gruppen $C=C$, $C=N$, $C=O$ in gleicher Weise nur dann chromophor sind, wenn das $C$ (bezw. bei $C=C$ das eine $C$) ein Glied eines Benzolringes ist. Diese Thatsache lässt sich auch von einer ganz anderen Seite auffassen.

Zu diesem Zweck befassen wir uns erst genauer mit der Strukturformel des Benzol. Die summarische Formel für dasselbe ist $C_6H_6$, und die Constitution ist nach der allgemein angenommenen Kekuléschen Theorie des Benzolringes folgendermassen zu schreiben:



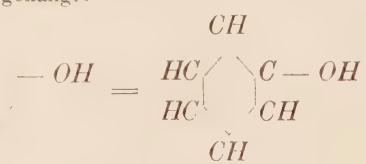

oder abgekürzt [2])

[1]) Man pflegt auch noch andere Gruppen als chromophor zu bezeichnen, z. B. die Gruppe



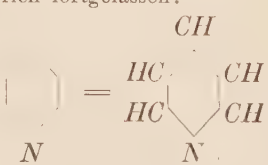

welche z. B. im Methylenblau enthalten ist. Dass dieses ganz unberechtigt ist, erhellt aus dem Umstand, dass man z. B. beim Methylenblau das *S*-Atom einfach fortlassen kann, ohne den Charakter des Moleküls als Farbstoff zu vernichten. Aus dem Methylenblau wird nämlich durch Fortlassung des *S* und Ersatz desselben durch 2 *H*-Altome Bindschedler's Grün (vgl. S. 40).

[2]) Soll ausgedrückt werden, dass eines der 6 *H*-Atome durch eine andere Gruppe oder ein anderes Element substituiert ist, so ist diese Gruppe mit einem Strich an den Benzolring gehängt:



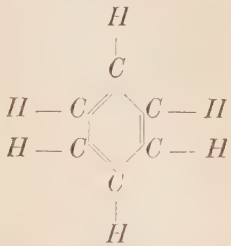

Phenol.

Soll dagegen ausgedrückt werden, dass das ganze *CH* durch etwas anderes substituiert ist, so ist der Strich fortgelassen:

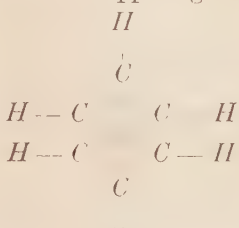



Pyridin.

Wie man sieht, sind bei dieser Schreibweise von den 4 Valenzen eines jeden Kohlenstoffatoms nur drei abgesättigt. Um also die sonst constante Vierwertigkeit des Kohlenstoffatoms wieder herzustellen, muss man annehmen, dass die übrig bleibenden Valenzen sich gegenseitig binden. Man kann sich diese Doppelbindungen in zwei verschiedenen Weisen denken. Entweder

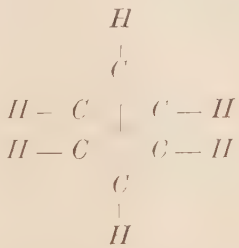


sind die benachbarten Kohlenstoffatome in abwechselnder Reihenfolge einmal einfach, das zweite Mal doppelt gebunden. Oder



es binden sich je zwei gegenüberliegende Ecken des Sechsecks noch einmal untereinander.

Die zweite Schreibweise kann man auch derart modifizieren, dass man die 6 freien Valenzen einem in der Mitte des Ringes gelegenen hypothetischen Kraftzentrum zustreben lässt:

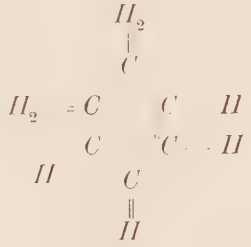


Für unsere Betrachtungen bieten diese Modifikationen keine Unterschiede, und wir halten uns deshalb an die erstere.

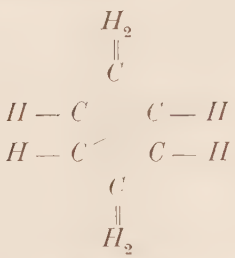
Die Doppelbindungen können nun durch Hinzutreten von einwertigen Atomen gelöst werden. Durch Zutritt von Wasserstoffatomen entstehen die hydrocyklischen Verbindungen. Dabei finden sich nun folgende auffällige Thatsachen.

Ein Benzol, bei dem nur ein *H*-Atom hinzuträte, existiert nicht. Das stimmt ganz mit der Theorie überein. Wenn nämlich eine Doppelbindung gelöst wird, so müssen damit gleichzeitig zwei Valenzen

frei werden, ob man nun die eine oder die andere Schreibweise anwenden mag. Demgemäss existiert ein Dihydrobenzol, welches nach der ersten Formel so,



nach der zweiten Formel jedoch so



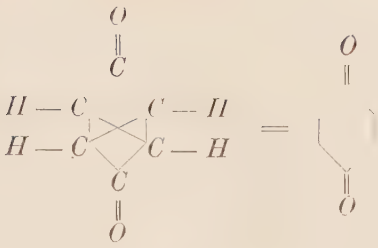
konstituiert sein muss. In Wirklichkeit existiert im freien Zustande nur das nach der zweiten Formel constituierte, während das erste nur in complicierteren Derivaten vorkommt.

Die erste Formel, bei der die gelösten Bindungen in benachbarter Stellung liegen, würde man als Ortho-Dihydrobenzol, das zweite, bei der die gelösten Bindungen einander gegenüber liegen, als Para-Dihydrobenzol bezeichnen.[1]) Dagegen ist ein Meta-Dihydrobenzol nicht denkbar.

Von den einfacheren Körpern, welche nach diesem Typus gebaut sind, ist der wichtigste das Chinon, ein Dihydrobenzol, bei dem die beiden Doppelwasserstoffatome je durch ein Sauerstoffatom substituiert sind, also entweder

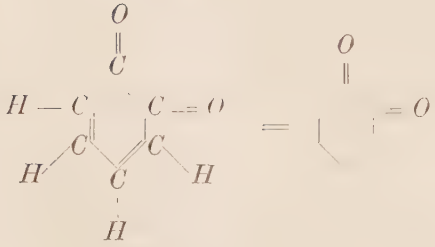
[1])

Die Stellung 1. 2 heisst Ortho (o.)
„ „ 1, 3 „ Meta (m.)
„ „ 1. 4 „ Para (p.)
„ „ 1, 5 ist identisch mit 1, 3
„ „ 1, 6 ist identisch mit 1, 2.



**Parachinon,**

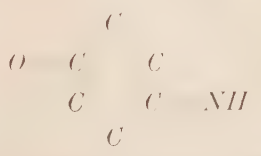
oder



**Orthochinon.**

Nur das Parachinon ist im freien Zustand existenzfähig. Von einem Benzolring, dessen Bindungen in der Weise verteilt sind wie beim Parachinon, sagt man daher, er sei nach dem Parachinontypus gebaut; ebenso spricht man von einem Orthochinontypus.

Betrachten wir nun wieder einen beliebigen Körper, welcher die oben genannte chromophore Gruppe $C = N$ enthält. Die Bedingung war, dass das $C$ einem Benzolring angehört. Aus dem oben gesagten geht nun hervor, dass, sobald ein $C$-Atom des Benzolringes nach aussen hin doppelt gebunden ist, auch bei einem zweiten $C$-Atome dieses Benzolringes eine Doppelbindung eintreten muss, entweder in der Para- oder in der Orthostellung. Also: die Gruppe $C = N$ bewirkt eine chinonartige Struktur des Benzolringes, zu dem das $C$ gehört, z. B.:



Ebenso verhält sich die Gruppe $C = O$, wofür das Chinon selbst das beste Beispiel ist,

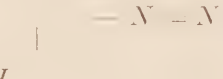
und die Gruppe $C = C$, z. B.

Statt also zu sagen: ein Körper ist gefärbt, weil er die chromophore Gruppe $C = N$, oder $C = O$, oder $C = C$ enthält, kann man auch sagen, der Körper sei gefärbt, weil er nach dem Chinontypus gebaut ist.

Damit haben wir 3 chromophore Gruppen, welche zunächst ohne Zusammenhang schienen, unter einen Gesichtspunkt gebracht. Und in der That sind nicht nur alle Körper, welche eine dieser Gruppen enthalten, nach dem Chinontypus gebaut, sondern auch umgekehrt, alle nach dem Chinontypus gebauten Körper enthalten eine dieser Gruppen.

Es ist verlockend, einen so einheitlichen Gesichtspunkt auch für die anderen gefärbten Körper durchführen zu wollen, denn es befriedigt uns mehr, ein Moment als Ursache für die Färbung erkannt zu haben als eine grosse Zahl von „chromophoren Gruppen“. Die dahin gehenden Bestrebungen haben in der That schon Erfolg gehabt.

Zunächst ist es eine durchaus nicht unbegründete Spekulation, die Azofarbstoffe in diese Betrachtung hineinzuziehen. Gehen wir beispielsweise vom Oxyazobenzol aus,



so würden wir mit Beziehung auf die Lehre von den chromophoren Gruppen den Körper deshalb als gefärbt erklären, weil er die Gruppe $N = N$ enthält. Aber die Formel des Oxyazobenzols lässt sich auch anders schreiben, nämlich:

Das in der ersten Formel an das $O$ befestigte $H$-Atom braucht man sich nur an das zweite $N$-Atom versetzt zu denken. Wie man sieht, ist in der zweiten Formel der linke Benzolring nach dem Parachinontypus gebaut.

Die letztere Schreibweise wird durch folgendes noch wahrscheinlicher gemacht. Wie nämlich schon oben gesagt wurde, hat $N = N$ nur dann die Eigenschaft einer chromophoren Gruppe, wenn sie zwischen zwei Benzolkernen steht, nicht aber, wenn sie als „Diazogruppe“ nur mit einem Benzolkern verbunden ist. Es liegt also offenbar nicht allein an der $N = N$-Gruppe, wenn ein Azokörper gefärbt ist, sondern es muss noch etwas zweites hinzukommen. Das drücken wir dann

eben viel einfacher aus, wenn wir auf das Vorhandensein der Azogruppe weniger Wert legen als auf die durch dieselbe (bezw. durch die aus ihr durch Umlagerung hervorgehende $N-NH$-Gruppe) hervorgerufene chinonartige Struktur des Moleküls.

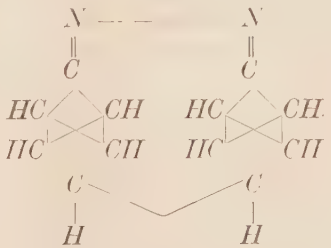
Es kann aber andererseits nicht geleugnet werden, dass die Azokörper in chemischer Beziehung sich mitunter so verhalten, dass sie nur die Gruppe $N=N$, nicht $N-NH$ enthalten können. Z. B. das Azobenzol selbst ist nur in folgender Schreibweise denkbar:[1])

Da aber wiederum es für viele Derivate des Azobenzols von Vorteil ist, die andere Schreibweise anzuwenden, so müssen wir für die Azokörper im allgemeinen eine „Tautomerie“ annehmen, d. h. eine Labilität des Moleküls, derart, dass es bald die eine, bald die andere Form annimmt.

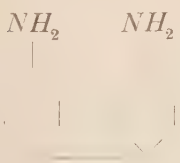
Diese Betrachtungen über die Azofarbstoffe lassen sich folgendermassen zusammenfassen: die Azogruppe selbst ist eine chromophore Gruppe, sie allein genügt zur Hervorrufung einer Färbung. Aber es besteht ein merkwürdiger Zusammenhang zwischen den Azokörpern und den nach dem Chinontypus gebauten Körpern: die Derivate des Azobenzols sind tautomer mit Körpern, welche nach dem Chinontypus gebaut sind.

Dieser Zusammenhang zwischen Azo- und Chinonkörpern veranlasst uns, auch für die übrigen chromophoren Gruppen einen solchen Zusammenhang zu suchen.

[1]) Man hat allerdings versucht, auch das Azobenzol selbst als einen chinonartig gebauten Körper aufzufassen:

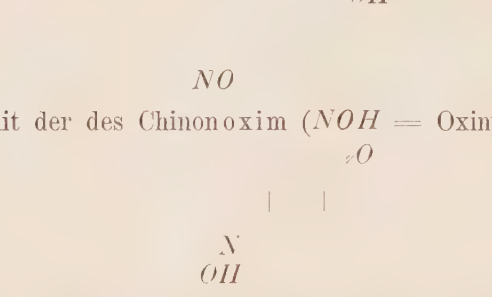


Für diese Auffassung spricht sogar der Umstand, dass es sehr leicht gelingt, Azobenzol in Benzidin

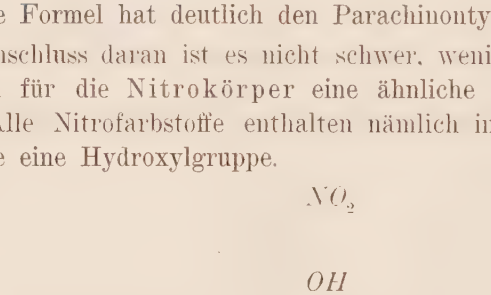


zu verwandeln.

Für die Nitrosogruppe ist derselbe sicher gestellt. So ist z. B. die Formel für das Para-Nitrosophenol

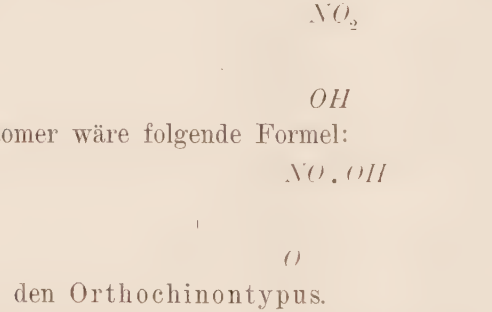


tautomer mit der des Chinonoxim ($NOH$ = Oxim)

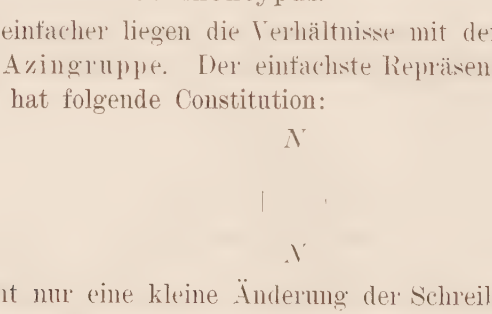


Diese letzte Formel hat deutlich den Parachinontypus.

Im Anschluss daran ist es nicht schwer, wenigstens vermutungsweise auch für die Nitrokörper eine ähnliche Constitution anzunehmen. Alle Nitrofarbstoffe enthalten nämlich in Orthostellung zur Nitrogruppe eine Hydroxylgruppe.

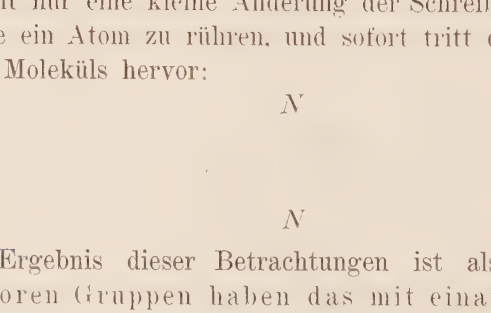


Damit tautomer wäre folgende Formel:

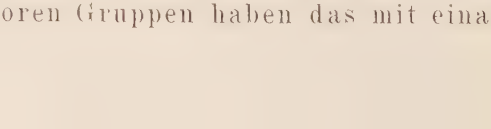


Diese zeigt den Orthochinontypus.

Noch einfacher liegen die Verhältnisse mit der jetzt allein übrig bleibenden Azingruppe. Der einfachste Repräsentant derselben, das Phenazin, hat folgende Constitution:



Man braucht nur eine kleine Änderung der Schreibweise eintreten zu lassen, ohne ein Atom zu rühren, und sofort tritt der Orthochinontypus des Moleküls hervor:



dass sie den Molekülen, zu denen sie gehören, eine chinonartige Struktur verleihen.

## 3. Der Zusammenhang der chemischen Constitution und der Art der Eigenfarbe.

Wenn wir im vorigen Kapitel den Zusammenhang zwischen Constitution und Färbung kennen gelernt hatten, so ist es jetzt unsere Aufgabe, den Zusammenhang zwischen der Constitution und der Art der Färbung kennen zu lernen. Es muss gleich voraus bemerkt werden, dass es durchaus nicht mit ebenso grosser Sicherheit möglich ist, aus der chemischen Formel die Art der Färbung zu erkennen, als es möglich ist, den Farbstoffcharakter überhaupt aus der Formel herauszulesen.

Wenn wir im vorigen Kapitel nur diejenigen Stoffe in Betracht gezogen hatten, welche eine für das Auge sichtbare Farbe besitzen, so müssen wir jetzt auch auf diejenigen Stoffe Rücksicht nehmen, welche nicht sichtbare Strahlen des Spectrums absorbieren. Es giebt eine Reihe von Substanzen, welche Absorptionsbanden im ultravioletten Teil des Spectrum zeigen, z. B. Petroleum, Anthracen. Eine systematische Untersuchung über derartige Körper steht noch aus. Nietzki hat eine rein empirische Regel aufgestellt: „Die einfachsten Farbstoffe (die also nur Violett und Blauviolett absorbieren) sind grünlich-gelb bis gelb; mit zunehmendem Molekulargewicht geht die Farbe im allgemeinen in orange, rot, rotviolett, violett, blau-violett, blau, blau-grün u. s. w. über". Genauere theoretische Untersuchungen über diesen Gegenstand stammen von M. Schütze. Seine Untersuchungen führten zu folgenden Resultaten: „Die Atome oder Atomgruppen bewirken bei ihrem Eintritt in das Molekül innerhalb derselben Farbstoffklasse (d. h. für denselben Chromophor), in demselben Lösungsmittel eine charakteristische Vertiefung oder Erhöhung des Farbentones."

Unter Vertiefung versteht Schütze das Fortschreiten der Absorptionsbande vom violetten zum roten Ende des Spectrum. Ein an sich farbloser Chromophor, der ein Absorptionsband im Ultraviolett besitzt, kann also durch Hinzutreten einer Atomgruppe in seiner Farbe vertieft werden, d. h. seine Absorptionsbande rückt ins Violett. Diese Farbe wird daher von dem Körper ausgelöscht, und die dem Auge sichtbar bleibenden Strahlen müssen die Complementärfarbe zu Violett sein, als gelblich-grün. Rückt durch weitere zutretende Gruppen das Absorptionsband ins Blaue, so wird die sichtbare Farbe des Stoffes orange sein. So kann die Bande das ganze Spectrum bis zum Rot durchwandern, und es entsteht, wenn das Absorptionsband

| | | |
|---|---|---|
| im | Violett | liegt, Grüngelb |
| „ | Indigo | „ Gelb |
| „ | Cyanblau | „ Orange |
| „ | Blaugrün | „ Rot |
| „ | Grün | „ Purpurn |
| „ | Grüngelb | „ Violett |
| „ | Gelb | „ Indigo |
| „ | Orange | „ Cyanblau |
| „ | Rot | „ Blaugrün |
| „ | Purpurn | „ Grün. |

Wenn ein Chromophor durch Hinzutreten von Atomgruppen seine Färbung in der eben geschilderten Richtung, von Gelbgrün über Gelb, orange etc. verändert, so nennt man dies also eine Vertiefung des Farbentones. Die umgekehrte Richtung ist die Erhöhung des Farbentones.

Die meisten Atome oder Atomgruppen bewirken bei ihrem Eintritt in das Molekül eine Vertiefung. Schütze nennt sie deshalb bathochrome Gruppen. Die anderen nennt er hypsochrome Gruppen. Bathochrome Gruppen sind z. B. Methyl, Aethyl, Phenyl. Mit zunehmendem Molekulargewicht steigt die bathochrome Eigenschaft; also vom Methyl zum Phenyl, ebenso von *Cl* über *Br* zu *J*.

Alle Kohlenwasserstoff-Radikale wirken bathochrom, in homologen Reihen nimmt die Farbentiefe mit steigendem Molekül zu.

Ebenso scheint die farbenändernde Wirkung der Elemente derselben Mendelejeff'schen Familie mit wechselndem Atomgewicht zuzunehmen (*Cl—Br—J*).

Wasserstoff ist nach Schütze ein hypsochromes Element. Sein Eintritt erniedrigt den Farbenton. Daraus erklärt Schütze die Farblosigkeit der Leukokörper, welche ja durch *H*-Addition aus den Farbstoffen entstehen. Anthrachinon ist gelb, absorbiert also violette Strahlen. Durch *H*-Addition entsteht Anthracen, welches ultraviolette Strahlen absorbiert und selbst farblos ist.[1])

Diese Regeln werden oft dadurch beeinträchtigt, dass mit dem Vorrücken einer Absorptionsbande vom Violett nach Rot zu ein zweiter Absorptionsstreif im Ultraviolett auftritt, der nun seinerseits wieder in den sichtbaren Teil des Spectrums wandert.

Alle diese Regeln gelten für die Farbstoffe, wenn man sie in dem gleichen Lösungsmittel untersucht, und unter sonst gleichen Bedingungen (gleiche Acidität oder Alkalinität).

Nun kann aber ein und derselbe Farbstoff seine Nuance ändern, wenn er unter andere Bedingungen kommt.

Am wichtigsten, weil am besten zu überblicken, ist die Farbabänderung durch die Zahl und die Art der Salzbildungen. Es enthalten nämlich, wie wir später sehen werden, die meisten basischen Farbstoffe mehrere Amidogruppen, von denen jede befähigt ist, mit Säuren Salze zu bilden. Je nach der Menge der eingetretenen Salzbildungen, oder, bei nur einfacher Salzbildung, je nach der Stelle, an welcher diese Salzbildung eingetreten ist, findet nun regelmässig ein auffälliger Farbenwechsel statt (vgl. hierüber das Kapitel Metachromasie).

In sehr zahlreichen Fällen hat die freie Farbbase oder Farbsäure eine andere Farbe als ihre Salze. Das beruht oft darauf, dass die Salzbildung mit einer gewaltigen inneren Umlagerung des Moleküls einhergeht.

Es muss zur Erläuterung dieser Erscheinung auf die speziellen Kapitel verwiesen werden. Vgl. z. B. die Erklärung des Farbenumschlags beim Phenolphthaleïn; beim Dimethylamidoazobenzol (S. 32), beim Rosanilin; beim Thionin (Kapitel „Metachromasie“).

Noch eine Bedingung giebt es, welche den Farbenton ändern kann. Wie schon gesagt, haben die meisten basischen Farbstoffe mehrere

[1]) Ob diese Auffassung den Thatsachen entspricht, erscheint deshalb zweifelhaft, weil die Aufnahme der *H*-Atome bei der Entstehung der Leukokörper eine tiefgreifende Veränderung des Moleküls herbeiführt, nämlich die Lösung der Chinon-Bindungen.

Amidogruppen, von denen für gewöhnlich nur eine mit einer Säure verbunden ist. Je nachdem, welche von den verschiedenen Amidogruppen des Moleküls die Salzbildung übernimmt, ändert sich der Farbenton.

## 4. Der Zusammenhang von gefärbtem Körper und Farbstoff.

Nicht jeder gefärbte Körper hat auch die Eigenschaft, andere Körper zu färben. Z. B. sind Chinon, Azobenzol, Anthrachinon, Indigoblau stark gefärbte Körper, ohne dass man im stande wäre, mit ihrer Lösung irgend ein Gewebe zu färben.

Die färbende Kraft wird dem Molekül eines gefärbten Körpers erst durch das Hinzutreten einer salzbildenden Gruppe gegeben, sei es einer sauren oder basischen.

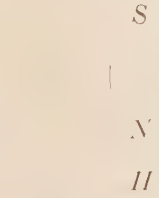
Einen gefärbten Körper, welcher diese salzbildende Gruppe nicht enthält, nennt man Chromogen.

Chromogen ist also ein gefärbter Körper aus der aromatischen Reihe, welcher zwar eine chromophore, aber keine salzbildende Gruppe besitzt und deshalb nicht im stande ist, zu färben.[1])

Wenn man sich streng an diese Definition des Wortes Chromogen hält, so ist bei zahlreichen Farbstoffen ein eigentliches Chromogen im freien Zustande nicht existenzfähig. Z. B. ist der Farbstoff

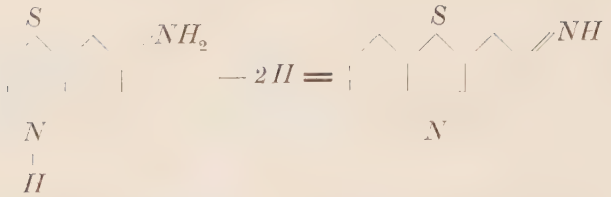
Imidothiodiphenylimid

nicht von der Gruppe $= NH$ zu befreien. In diesem Fall bezeichnet man das Thiodiphenylamin



als das Chromogen. Dieses ist zwar farblos, aber sein Amidoderivat spaltet sehr leicht 2 *H*-Atome ab und geht dabei in obigen Farbstoff über:

[1]) Der Satz, dass Körper, welche keine salzbildende Gruppe besitzen, nicht im stande sind, zu färben, bedarf einer Einschränkung. Wie wir weiter unten sehen werden, sind die Fettfarbstoffe frei von eigentlichen salzbildenden Gruppen.



Amidothiodiphenyplamin Imidothiodiphenylimin

Mit „salzbildender Gruppe“ ist eine solche Gruppe gemeint, welche dem Körper den Charakter einer Säure oder Base verleiht, so dass dieser Körper befähigt ist, mit einer Base bezw. einer Säure ein Salz zu bilden.

Derartige Gruppen sind:

a) säurebildende Gruppen (elektro-negative):

1. Die Hydroxylgruppe, *OH*, welche zwar nicht immer, aber doch stets, wenn sie an einen Benzolkern gebunden ist, den Charakter einer Säure bildenden Gruppe besitzt. Einen mit einer oder mehreren *OH*-Gruppen behafteten Benzolkern nennt man allgemein ein Phenol und spricht daher auch von Farbphenolen.

2. Die Carboxylgruppe, *CO OH*, welche jeden organischen Körper zu einer „Carbonsäure“ macht.

3. Die Nitrogruppe, $NO_2$

4. Die Sulfosäuregruppe, $HSO_3 = SO_2\,OH$

b) basenbildende elektropositive Gruppen:

$NH_2$, die Amidogruppe,

mit ihren Homologen.

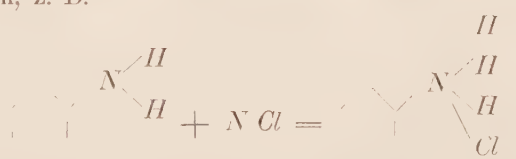
$NH\,.\,CH_3$ Monomethylamido,

$N\,.\,(CH_3)_2$ Dimethylamido,

ferner die zweiwertige

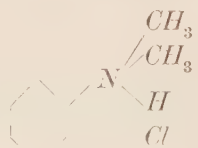
$NH$ Imidogruppe.

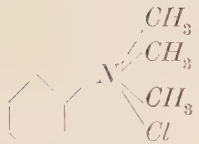
Diese Gruppen sind durch die Eigenschaft des *N*, seinen sonst dreiwertigen Charakter in einen fünfwertigen umzuwandeln, befähigt, Salze zu bilden, z. B.



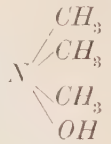
Anilin salzsaures Anilin.

Die Dimethylamidogruppe hat die Eigenschaft, zwei verschiedene Formen von Salzen zu bilden, z. B.

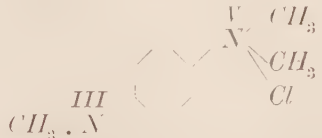
a)  entstanden aus Anilin $+ Cl\,.\,H$

b)  entstanden aus Anilin $+ Cl \cdot CH_3$ (Chlormethyl).

Aus dem Salz b) lässt sich eine Base darstellen, bei



der das $N$ nirgends direkt an $H$ gebunden ist. Eine solche Base bezeichnet man als (quaternäre) Ammoniumbase. Sie zeichnet sich durch eine viel stärkere Basicität aus als die Amidobasen. Auch einen Körper von folgender Constitution:



würde man als das Chlorid einer Ammoniumbase bezeichnen, weil der Stickstoff fünfwertig auftritt und nirgends an ein freies $H$-Atom gebunden ist. Gerade diese Art von Ammoniumbasen, bei denen der Stickstoff mit doppelter Valenz an einen Benzolkern gebunden ist, spielen in der Farbstoffchemie eine grosse Rolle.

Die Amidobasen (mit den Gruppen $NH_2$, $NH \cdot CH_3$, $N(CH_3)_2$) sind in ihrem Verhalten dem Ammoniak, $NH_3$, ähnlich; sie sind zwar ziemlich starke Basen, können jedoch durch $Na\,OH$ aus ihren Salzen in Freiheit gesetzt werden. Die Ammoniumbasen haben dagegen einen so starken Basencharakter, dass sie aus ihren Salzen durch $Na\,OH$ nicht abgeschieden werden können. Dagegen können ihre Chloride durch Behandeln mit feuchtem Silberoxyd zersetzt werden:

$$2\,N \cdot (CH_3)_4\,Cl \qquad + Ag_2\,O + H_2\,O =$$

Tetramethylammoniumchlorid

$$2\,N(CH_3)_4 \cdot OH \qquad + 2\,AgCl$$

freie Tetramethylammoniumbase unlösliches Chlorsilber.

Entsteht ein Farbstoff durch das Hinzutreten einer säurebildenden Gruppe zu einem Chromogen, so nennt man ihn einen sauren Farbstoff; entsteht er durch Hinzutreten einer basenbildenden Gruppe, nennt man ihn einen basischen (**nicht** alkalischen) Farbstoff.

Ein saurer Farbstoff kann entweder eine solche Säure sein oder ein Salz einer solchen Säure sein, z. B. bezeichnet man sowohl die Pikrinsäure selbst wie auch das pikrinsaure Natron als einen sauren

Farbstoff; die freie Pikrinsäure kann man ausserdem als eine „Farbsäure“ bezeichnen.

Ein saurer Farbstoff ist also entweder eine Farbsäure oder ein Salz einer solchen.

Ebenso ist ein basischer Farbstoff entweder eine Farbbase oder ein Salz einer solchen.

Es ist also für die Bezeichnung „saurer“ oder „basischer“ Farbstoff gleichgültig, wie der Farbstoff gegen Lakmuspapier reagiert. Nur bei wenigen, sehr hellen Farbstoffen lässt sich übrigens die Reaktion gegen Lakmuspapier feststellen, weil die meisten anderen Farbstoffe das Lakmuspapier einfach mit ihrer Farbe anfärben und die Reaktion des Lakmusfarbstoffes verdecken. Sowohl die gegen Lakmus sauer reagierende Pikrinsäure, wie auch das gegen Lakmus neutral reagierende pikrinsaure Natron sind saure Farbstoffe.

Die meisten Farbstoffe besitzen nicht nur eine, sondern mehrere salzbildende Gruppen. Daher bilden die meisten Farbbasen nicht nur einsäurige, sondern auch zweisäurige und dreisäurige Salze. Von diesen gilt die Regel, dass nur die einsäurigen Salze beständig sind; die zwei- und dreisäurigen entstehen nur bei einem grossen Überschuss einer Mineralsäure und zersetzen sich schon bei blosser Verdünnung mit Wasser in das einsäurige Salz und freie Säure. Die zwei- und dreisäurigen Salze sind stets anders gefärbt als die einsäurigen.

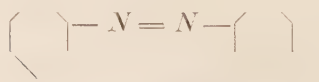
Dagegen sind saure Farbstoffe, welche mehrere säurebildende Gruppen besitzen, im stande, an jeder dieser Gruppen mit Alkalien eine Salzbildung einzugehen, sodass von jeder Trisulfosäure drei Reihen von Salzen existieren, deren jedes auch ohne Überschuss von Alkali in wässriger Lösung beständig ist.

Je stärker salzbildend ein Farbstoff ist, desto energischer färbt er im allgemeinen. Daher sind Farbstoffe mit mehreren salzbildenden Gruppen im Molekül bessere Farbstoffe als die mit nur einer salzbildenden Gruppe. Wie schon gesagt, zeigt zwar die zweite oder dritte salzbildende Gruppe wenig Neigung dazu, sich selbst zu einem Salz zu neutralisieren, sie erhöht nur im allgemeinen die Acidität bezw. Basicität des Farbstoffs und damit sein Färbevermögen.

Gleichzeitig wird durch das Hinzutreten von solchen Gruppen die Nuance des Farbstoffs häufig vertieft. Deshalb nennt man solche hinzutretenden salzbildenden Gruppen „auxochrome Gruppen“.

Ich will diese Verhältnisse noch an zwei Beispielen erläutern.

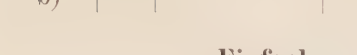
I.

a)  Azobenzol.

**Chromogen.**

b) Azobenzolsulfosäure.

**Einfacher, saurer Farbstoff.**

c)  Oxyazobenzolsulfosäure.

**Saurer Farbstoff mit auxochromer Gruppe.**

II.

a) Thiodiphenylamin.

**Chromogen.**

b) Imidothiodiphenylimin.

**Einfacher, basischer Farbstoff.**

c) Thionin.

**Basischer Farbstoff mit auxochromer Gruppe.**

Befinden sich an einem Chromogen verschiedene salzbildende Gruppen, welche einander widersprechen, indem die einen sauer, die anderen basisch sind, so wird die Natur des Farbstoffes durch das Überwiegen der einen oder der anderen Gruppe bestimmt. Halten sich die sauren und die basischen Gruppen einigermassen das Gleichgewicht, so vereinigt der Farbstoff oft die Eigenschaften der sauren und basischen Farbstoffe. Ich möchte diese Farbstoffe als die amphoteren Farbstoffe bezeichnen.

Ist neben basischen Gruppen auch nur eine einzige $SO_3H$-Gruppe, so überwiegt deren Acidität so stark, dass der Farbstoff wie ein rein saurer Farbstoff sich verhält. Andere, gleichzeitig vorhandene saure und basische Gruppen schwächen sich gegenseitig so ab, dass in der

Regel wenig farbkräftige Farbstoffe entstehen (vgl. z. B. Methylenviolett).

Wenn man die wässerige Lösung eines sauren und eines basischen Farbstoffs zusammenbringt, so fällt in der Regel ein Körper aus, welcher durch Vereinigung der Farbsäure mit der Farbbase entsteht. Diese Körper nennt man nach Ehrlich **neutrale Farbstoffe.** Z. B.

Pikrinsaures Natron + Chlorid der Methylenblaubase (d. i. Methylenblau) = Pikrinsaure Methylenblaubase + $ClNa$.

Die neutralen Farbstoffe sind durchgängig in Wasser ziemlich schwer oder gar nicht löslich, haben jedoch zum Teil die Eigenschaft, sich in einem Überschuss des sauren, mitunter auch des basischen Farbstoffes zu lösen (Ehrlich). Z. B. sind diejenigen Farbstoffe, welche durch eine Vereinigung eines basischen Farbstoffes mit den sauren Farbstoffen Orange G oder Säurefuchsin entstehen, in einem Überschuss dieser Farbstoffe löslich, nicht aber z. B. diejenigen neutralen Farbstoffe, deren saurer Bestandteil die Pikrinsäure ist.

In Alkohol sind die neutralen Farbstoffe im Allgemeinen leichter löslich als in Wasser.

Diese Reaktion, das Entstehen eines in Wasser unlöslichen neutralen Farbstoffes, kann man dazu benutzen, um zu prüfen, ob ein beliebiger Farbstoff sauer oder basisch ist. Giebt nämlich die wässerige Lösung eines Farbstoffes mit einer gesättigten wässerigen (nicht alkoholischen!) Lösung von Pikrinsäure einen Niederschlag, so war es ein basischer Farbstoff; giebt sie keinen Niederschlag, war es ein saurer Farbstoff. In derselben Weise wie die Pikrinsäure kann man auch die Gerbsäure benutzen.

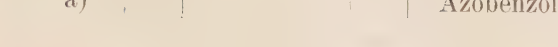
Um einer Verwechslung vorzubeugen, sei hier darauf aufmerksam gemacht, dass man in der Färbeindustrie unter einem neutralen Farbstoff etwas ganz anderes versteht als nach den obigen Definitionen. Man bezeichnet dort nämlich als „Neutral"- oder „Salz"-Farbstoffe eine Reihe von Farbstoffen, welche wir nach den obigen Definitionen unter die sauren rechnen müssen, und welche sich von den anderen sauren Farbstoffen dadurch unterscheiden, dass sie in neutraler oder alkalischer Lösung pflanzliche (Baumwolle) und tierische Fasern anfärben, während alle anderen sauren Farbstoffe in angesäuerter Lösung zur Verwendung kommen. Da jedoch dieses Verhalten für die Histologie keine Bedeutung hat, stehen wir nicht an, uns über diese in der Technik gebräuchlichen Ausdrücke hinwegzusetzen und uns an die oben auseinandergesetzte, rationelle, von Ehrlich begründete Nomenclatur zu halten.

Die neutralen Farbstoffe im Ehrlich'schen Sinne haben in der Industrie gar keine Bedeutung.

Nun kann aber auch ein Farbstoff aus einem Chromogen durch Hinzutreten einer indifferenten Gruppe entstehen, wie $-O.CH_3$, $OC_2H_5$, oder nur $=O$. Derartige Farbstoffe, deren Bedeutung für die Histologie ich nachgewiesen habe, bezeichne ich als indifferente Farbstoffe. Ich gebe ein Beispiel:

a) Azobenzol.

**Chromogen.**

b)  Aethoxyazobenzol.

**Indifferenter Farbstoff.**

Wir haben somit in diesem Kapitel folgende Farbstoffklassen kennen gelernt

1. basische
2. saure
3. neutrale
4. amphotere
5. indifferente

} Farbstoffe.

## 5. Allgemeine chemische Eigenschaften der Farbstoffe.

### a) Reduktion und Verküpung.

Wie das Chinon, so lassen sich auch alle nach seinem Typus gebauten Farbstoffe reduzieren. Da ein grosser Teil der Farbstoffe eine chinonartige Struktur besitzt, so ergiebt sich daraus die Reduktionsfähigkeit derselben. Aber auch diejenigen Farbstoffe, welche nicht nach diesem Typus gebaut sind, sind reduktionsfähig.

Die Reduktionsfähigkeit ist eine gemeinsame Eigentümlichkeit aller Farbstoffe. Sie besteht stets in der Aufnahme von *H*-Atomen.

Die Reduktionsprodukte der Farbstoffe sind bis auf wenige Ausnahmen farblos und heissen Leukokörper. Man spricht daher von Leukomethylenblau, u. s. w.

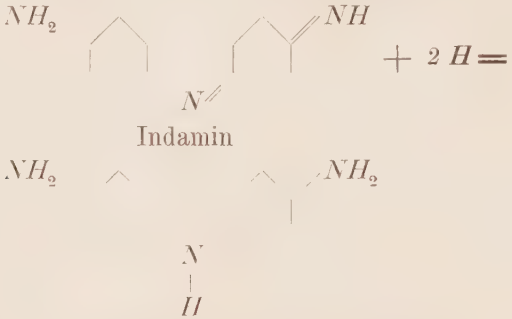
Die Nitrogruppe $NO_2$ wird zur Amidogruppe $NH_2$ reduziert.

Die Azogruppe geht unter der Einwirkung von Reduktionsmitteln entweder in die Hydrazogruppe, $NH-NH$ über, weiterhin wird sie unter Aufnahme von 4 *H*-Atomen in zwei Amidogruppen gespalten

Azobenzol — Hydrazobenzol

2 Mol. Anilin

Die nach dem Chinontypus gebauten Farbstoffe werden in der Weise reduziert, dass die chinonartige Doppelbindung unter Aufnahme von *H*-Atomen in einfache Bindungen übergeführt werden, z. B.:




Indamin




Leukoindamin oder Diamidodiphenylamin.

Die Azingruppe wird in der Weise reduziert, dass jedes der beiden *N*-Atome ein *H* aufnimmt.

Phenazin

wird reduziert zu

Leukophenazin.

Als Reduktionsmittel kann man benutzen

a) in alkalischer Lösung: Zinkstaub, Zinnchlorür (in einem grossen Überschuss von *Na OH* gelöst und filtriert), Traubenzucker, Schwefelammonium.

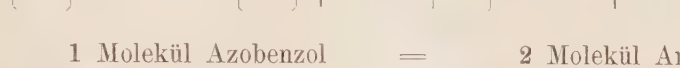
b) in saurer Lösung: nascierenden Wasserstoff (Zinkstaub + *HCl*), Natriumbisulfit, Natriumhydrosulfit, Zinnchlorür.

Die Leichtigkeit, mit der die Farbstoffe reduziert werden, ist verschieden. Die meisten basischen Farbstoffe werden in alkalischer Lösung viel leichter reduziert als in saurer. Für eine ganz leicht alkalische Lösung (von der Alkalinität der Nährbouillon) enthält folgende kleine Reihe die Farbstoffe derart geordnet, dass jeder folgende Farbstoff leichter reduzierbar ist als der vorhergenannte: Methylviolett, Neutralrot, Safranin, Methylenblau.

Ein Teil der Leukokörper hat die Eigentümlichkeit, dass sie durch blosse Berührung mit dem Sauerstoff der Luft in den Farbstoff zurückverwandelt werden. Der Sauerstoff verbindet sich dabei mit

dem Wasserstoff der Leukokörper zu $H_2O$. Von denjenigen Farbstoffen, deren Leukokörper diese Eigenschaft hat, sagt man, sie „verküpen", und unterscheidet küpenbildende oder reoxydable und nicht küpenbildende, nicht reoxydable Farbstoffe.[1])

Alle diejenigen Farbstoffe, deren Molekül bei der Reduktion in zwei Moleküle gespalten wird (das sind die Azofarbstoffe):



1 Molekül Azobenzol = 2 Molekül Anilin),

sind natürlich nicht verküpbar. Die anderen Farbstoffe, welche bei der Reduktion einfach *H*-Atome anlagern, ohne sonst eine tiefgreifende Veränderung des Moleküls zu erleiden, sind mit Ausnahme der Nitrofarbstoffe alle verküpbar.

Es giebt einige Farbstoffe, deren Leukokörper bei der Reoxydation einen anderen Farbstoff liefern als das Ausgangsprodukt, und zwar 1) diejenigen Farbstoffe, welche Halogene am Benzolring enthalten, z. B. Eosin, welches 4 Brom-Atome enthält. Bei der Reduktion werden zuerst diese durch *H* ersetzt. Natürlich haben die *Br*-Atome bei der Reoxydation keine Gelegenheit, sich wieder an das Molekül zu binden.

2) Diejenigen Farbstoffe, welche ausser einer Azogruppe noch eine zweite chromophore Gruppe enthalten, vgl. die Safraninazofarbstoffe.

Ein einfacher Versuch, welcher die Verküpbarkeit der Farbstoffe demonstriert, ist folgender. Man erhitze im Reagenzglas eine Methylenblaulösung mit einer Messerspitze voll Zinkstaub. Dieser wirkt, indem er selbst zu Zinkoxyd oxydiert wird, als Reduktionsmittel und entfärbt das Methylenblau vollkommen. Giesst man nun die farblose Flüssigkeit auf ein Stück Filtrierpapier, so nimmt sie im Augenblick ihre blaue Farbe wieder an.

### b) Die Löslichkeitsverhältnisse der Farbstoffe und die mehrsäurigen und mehrbasischen Farbsalze.

Ganz allgemeingültige Regeln über die Löslichkeit der Farbstoffe lassen sich natürlich nicht geben. Jedoch giebt es immerhin einige Regeln, die von grossem Nutzen für die Beurteilung eines Farbstoffes sein können.

Die freien Farbbasen kann man auch für unsere jetzige Betrachtung wieder in die Amido- und die Ammoniumbasen einteilen. Die freien Ammoniumbasen sind in Wasser gut löslich, z. B. die Methylenblaubase. Die Amidobasen sind dagegen meist in Wasser schwer, besser in Alkohol, Amylalkohol, Äther, Chloroform löslich.

[1]) Als „Küpe" bezeichnet man in der Indigblauflärberei die Lösung des Indigweiss, welches aus dem Indigoblau durch Reduktion gewonnen wird, und welche unter dem Einfluss des Luftsauerstoffs in Indigblau verwandelt wird.

Farbstoffe, welche nur eine Amidogruppe haben, sind gewöhnlich in Wasser so gut wie unlöslich, in Alkohol besser, noch besser in Äther, und was besonders wichtig ist, in fetten Ölen löslich. Die Lösungsaffinität in den Fetten ist sogar so gross, dass oft aus einer wässrigen Lösung ihrer Salze die freie Base durch Fett extrahiert werden kann, während die Säure, an die sie gebunden war, im Wasser zurückbleibt.

Farbbasen mit mehreren Amidogruppen sind gewöhnlich, wenn auch immer nur in sehr geringem Grade in Wasser löslich und haben keine erhebliche Lösungsaffinität für fette Öle.

Die Salze der Farbbasen verhalten sich verschieden. Zunächst kommt es auf die Art der Säure an, mit der die Salzbildung stattgefunden hat. Die Salze der Salzsäure, Salpetersäure, Essigsäure, neigen zu grösserer Löslichkeit als die der Schwefelsäure. Sehr schwer oder garnicht löslich sind die Salze der Pikrinsäure, Gerbsäure, Molybdänsäure, Ferrocyanwasserstoffsäure und anderer complexer Säuren wie Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure. Viele Salze dieser Säuren sind in Alkohol besser löslich, z. B. die Pikrate, Molybdate. Das molybdänsaure Methylenblau ist auch in Alkohol äussert schwer löslich, eine Thatsache, auf der Bethe seine Fixationsmethode der vitalen Methylenblaufärbung gegründet hat.

Die mehrbasischen Farbbasen bilden je nach der Menge der ihnen zur Verfügung stehenden Säure mehrere Reihen von Salzen. Und zwar bildet sich beim Zusammentreffen von 1 Molekül Farbbase mit 1 Molekül *HCl* zunächst das einsäurige Salz. Zur Bildung des zweisäurigen Salzes genügt nun aber nicht der Überschuss von 1 Mol. *HCl*, sondern erst bei viel höherem Überschuss an freier *HCl* findet die Bindung eines zweiten Moleküls *HCl* statt. Das lösende Medium muss einen bedeutenden Aciditätsgrad besitzen, wenn die Bildung des zweisäurigen Farbstoffs von statten gehen soll. Diese zweisäurigen Salze der Farbbasen sind nun äusserst labil. Man kann sie mit grösster Leichtigkeit wieder in das einsäurige Salz + 1 Mol. *HCl* spalten, und zwar entweder

1. durch blosses Verdünnen mit Wasser. Dabei zerfällt, mit der Herabsetzung des Aciditätsgrades des Lösungsmittels, das zweisäurige Salz glatt in das einsäurige + freie Säure. So ist z. B. das zweisäurige Salz des Methylviolett grün. Man erhält es durch Zusatz von freier *HCl* zu einer Lösung von Methylviolett. Durch blosses Verdünnen mit Wasser wird die Lösung zunächst blau, dann wieder violett. Die blaue Lösung ist nichts weiter als eine Mischung des einsäurigen, violetten und des zweisäurigen, grünen Salzes.

2. durch Ausschütteln des zweisäurigen Farbstoffs z. B. mit Amylalkohol. Schüttelt man durch *HCl* grün gefärbte Methylviolettlösung mit Amylakohol, so färbt sich dieser violett.

Zur Bildung mehrsäuriger Salze sind besonders die sog. starken Mineralsäuren befähigt, die sich im Zustand höchster elektrolytischer Dissociation befinden. Selbst concentrierte Essigsäure bildet mit Methylviolett höchstens ein zweisäuriges Salz.

Auf dieser Thatsache beruhen die Farbreaktionen zum Nachweis der freien Salzsäure z. B. im Magensaft. Diese sind alle nicht spezifisch für Salzsäure, sondern werden ebenso gut von anderen Mineralsäuren gegeben, nicht aber von organischen Säuren, wie Essigsäure, Milchsäure, Buttersäure. Die Salzsäure pflegt im Mageninhalt in einer solchen Concentration zu sein, dass sie immer nur einen Teil des Methylvioletts in das grüne zweisäurige Salz umwandelt, so dass als Mischton aus dem Methylviolett und seinem grünen zweisäurigen Salz ein blauer Ton entsteht.

Die freien Farbsäuren verhalten sich ganz verschieden. Die Farbphenole, d. h. Farbsäuren, welche nur *OH*-Gruppen enthalten, sind in Wasser so gut wie unlöslich. Das Vorhandensein von mehreren *OH*-Gruppen erhöht die Löslichkeit etwas. Die Farbphenole lösen sich in Äther.

Carbonsäuren, d. h. Säuren mit der Gruppe *CO.OH* sind in Wasser schwer, in Alkohol besser löslich, noch besser in Äther, Chloroform (z. B. die Säure des Eosin).

Dagegen sind die Sulfosäuren, Säuren mit der Gruppe $SO_3H$ viel besser wasserlöslich. Eine Ausnahme machen einige Sulfosäuren aus der Reihe der Tetrazofarbstoffe (Congorot), welche fast absolut unlöslich in Wasser sind.

Die Alkalisalze der Farbsäuren sind wohl durchweg in Wasser löslich. Die Salze der Schwermetalle sind oft unlöslich in Wasser, Alkohol, Äther, also überhaupt nicht löslich. Solche Schwermetallsalze der Farbsäuren nennt man Lacke. Man thut jedoch gut, mit dem Begriff des Lackes nicht unbedingt die Schwerlöslichkeit zu verbinden (vgl. Kapitel „Beizenfärbung“).

Mehrbasische saure Farbstoffe bilden je nach der Menge des vorhandenen Alkali, also im Gegensatz zu den basischen Farbstoffen, ein-, zwei- oder mehrbasische Salze, welche durch Verdünnung mit Wasser nicht zerlegt werden.

Die Salze einiger weniger, schwach saurer Farbphenole lassen sich durch fette Öle in derselben Weise spalten, wie es von den basischen Farbstoffen mit nur einer Amidogruppe angegeben war.

Die indifferenten Farbstoffe sind in Wasser absolut unlöslich, besser in Alkohol, leicht in Äther, Chloroform, fetten Ölen löslich. Die neutralen Farbstoffe sind wohl durchweg in Alkohol löslich, schwer dagegen in Wasser. Bei einer Reihe von ihnen lässt sich durch einen Überschuss des sauren, manchmal auch des basischen

Farbstoffes eine wässerige Lösung erreichen. Dies ist nicht möglich z. B. bei sämtlichen neutralen Farbstoffen, deren saure Komponente ein Nitrofarbstoff ist. Im Gegenteil, während z. B. pikrinsaures Methylenblau in Wasser ein wenig löslich ist, ist es in wässeriger Pikrinsäurelösung ganz unlöslich.

Über die chemischen Vorgänge, welche bei der Lösung der neutralen Farbstoffe im Überschuss eines ihrer Komponenten vor sich gehen, vgl. das Kapitel: „Färbung mit neutralen Farbgemischen".

### c) Die Echtheit der Farben.

Unter Echtheit einer Farbe versteht man die Widerstandsfähigkeit gegen irgend welche entfärbenden Einflüsse, Licht, Säuren, Alkali, Wasser etc. Man kann also nicht schlechtweg eine Farbe als echt, die andere als unecht bezeichnen. Ja man kann manchmal einen Farbstoff nicht ohne weiteres als lichtecht oder lichtunecht bezeichnen, da das Substrat manchmal einen Einfluss auf die Lichtechtheit hat. So ist Methylenblau auf Baumwolle lichtechter als auf Wolle.

Die Licht-Echtheit der verschiedenen Farbstoffe ist äusserst verschiedenartig. Der Zusammenhang zwischen Constitution und Lichtechtheit ist nicht sicher zu erkennen. Kleine Unterschiede der Constitution können erhebliche Unterschiede der Lichtechtheit bewirken. So ist Indigoblau äusserst lichtecht, seine Sulfosäure sehr unecht gegen Licht.

Nach Untersuchungen von Chevreul wird die bleichende Kraft des Lichts durch Sauerstoff und Feuchtigkeit bedeutend erhöht. Manche wenig lichtechte Farben bleichen im Lichte nicht aus, wenn sie in trockenem Sauerstoff oder im Vacuum aufbewahrt werden. Wahrscheinlich besteht die Wirkung des Lichts in der Einleitung einer langsamen Oxydation. Vielleicht wirkt das bei Verdunstung des Wassers entstehende Ozon und Wasserstoffsuperoxyd lebhaft mit. In anderen Fällen soll jedoch durch das Licht eine Reduktion eingeleitet werden. Bei den in der Mikroskopie gebräuchlichen Farbstoffen ist dies jedoch nicht anzunehmen, da die meisten farblosen Reduktionsprodukte der Farbstoffe durch Berührung mit Luft wieder oxydiert werden. Im Übrigen hat die Lichtechtheit nur geringes Interesse in der Mikroskopie.

Bei der Echtheit gegen Säuren und Alkalien muss man zwei Dinge unterscheiden. Erstens kann eine Säure oder Base dem Gewebe den Farbstoff entreissen, ohne ihn wesentlich zu verändern. Zweitens kann aber die Säure- oder Laugen-Unechtheit darin begründet sein, dass der Farbstoff durch diese Mittel in einen farblosen oder in einen anders gefärbten Stoff verwandelt wird. So ist z. B. die Färbung mit Säurefuchsin deshalb unecht gegen Alkalien, weil das Säurefuchsin

an sich in alkalischer Lösung farblos ist. Die entfärbende Kraft des Alkali gegenüber dem Säurefuchsin geht der Farbstoff-extrahierenden Kraft nicht parallel. Wenn z. B. ein mit Säurefuchsin gefärbtes Gewebe durch Alkali völlig entfärbt ist, so kann man, nach gründlicher Entfernung des alkalischen Bades, durch blosse nachträgliche Ansäuerung die rote Farbe des Gewebes wieder hervorrufen. Das Alkali hatte das Säurefuchsin entfärbt, aber nicht extrahiert.

Ein mit Congorot gefärbtes Gewebe ist gegen Säuren unecht, weil diese die rote Farbe in Blau umschlagen lassen. Dabei extrahiert die Säure das Congorot in keiner Weise.

Da, wie wir später sehen werden, die Farbstoffe in verschiedener Weise vom Gewebe fixiert werden, durch Insorption oder durch Injunktion, so muss auch Säure und Alkali eine ganz verschiedene Wirkung je nach den Umständen ausüben. Darüber s. das Kapitel: Entfärbung.

### d) Fluorescenz.

Unter Fluorescenz versteht man die Eigenschaft einiger Körper, dass sie das Licht von ihrer Oberfläche in einer von dem auffallenden Licht abweichenden Nuance reflektieren. Die Fluorescenz ist nicht allein eine Eigenschaft mancher Farbstoffe, sondern auch ungefärbte Stoffe können fluorescieren, z. B. Petroleum, Chinin, und was hier besonders interessant ist, das Fluoran,

der farblose Chromophor des Fluoresceïn.

Nicht jedes auffallende Licht erregt Fluorescenz. Bei den farblosen Körpern sind es die ultravioletten Strahlen, welche vor allem die Fluorescenz erregen und durch fluorescierende Schirme geradezu sichtbar gemacht werden können. Bei den gefärbten Körpern erregen diejenigen Strahlen die Fluorescenz, welche sie im durchfallenden Licht absorbieren.

Alle fluorescierenden Körper, deren Constitution bekannt ist, besitzen eine ringförmige Constitution. Es sind zwei Benzolringe durch eine doppelte Bindung ringförmig verbunden. Diese Gruppierung der Atome bildet die „fluorophore Gruppe“. Daher tritt die Fluorescenz in folgenden Farbstoffgruppen zu Tage:

Thiazine, Oxazine, Azine, Safranine, Pyronine, Phthaleïne.

Häufig wechselt der Grad der Fluorescenz ausserordentlich mit dem Lösungsmittel. Fluoresceïn fluoresciert nur als Salz (Uranin), nicht als freie Säure. Die Oxazine fluorescieren als Salze. Neutralrot fluoresciert nur als freie Base in ätherischer Lösung.[1]) Methylenviolett fluoresciert in alkoholischer Lösung. Sehr häufig ist das Aceton ein viel besseres Lösungsmittel zur Hervorbringung der Fluorescenz als Alkohol, z. B. beim Eosin, Methylenviolett.

Die Farbe der Fluorescenz ist nicht einheitlich, sondern lässt sich spektroskopisch stets noch zerlegen. Die Gesamtfarbe ist beim Chinin bläulich, beim Fluoresceïn gelblichgrün, bei Eosin gelb, beim Methylenviolett und Oxonin rotbraun.

Über die biologische Wirkung der Fluorescenz vgl. „vitale Färbung".

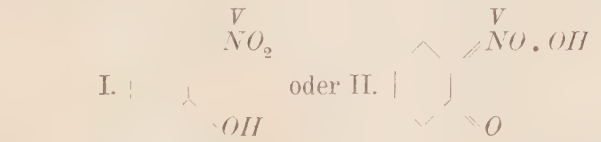
[1]) Nach Rothberger und Alfred Wolff wird das Neutralrot durch Bakterium coli zu einem in wässeriger Lösung lebhaft gelblich fluorescierenden Körper reduziert, der auf andere Weise aus dem Neutralrot nicht darstellbar zu sein scheint.

# II. Spezielle Chemie der Farbstoffe.

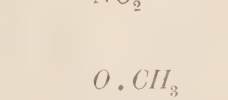
## 1. Die Nitrofarbstoffe.

Die chromophore Gruppe dieser Farbstoffe ist die Nitrogruppe, $NO_2$. Diese hat die Eigenschaft, dass sie einer am gleichen Benzolring befindlichen $OH$-Gruppe stark saure Eigenschaften verleiht.

Die sehr zahlreichen Nitrokörper, welche Farbstoffcharakter haben, haben die gemeinsame Constitutionseigenthümlichkeit, dass sie in Orthostellung zur Nitrogruppe eine Hydroxylgruppe besitzen. Daraus lässt sich schliessen, dass die Nitro- und die Hydroxylgruppe eine innere Beziehung zu einander haben. Und in der That ist man auch aus anderen Gründen berechtigt, einen solchen anzunehmen. Diese Beziehung würde darin zum Ausdruck gebracht werden können, dass man (in Anlehnung an entsprechende Nitrosoverbindungen) eine Tautomerie folgender Art annimmt. Z. B. das hypothetische *o*-Nitrophenol könnte auf zwei Weisen gedacht werden, entweder:




Die zweite Schreibweise zeigt deutlich den Orthochinontypus, und die Färbung einer solchen Verbindung wäre nicht weiter auffallend. Wenn wir aber erfahren, dass die nach dem Typus




gebauten Körper farblos sind, so müssen wir daraus den Schluss ziehen, dass die $NO_2$-Gruppe an sich nicht chromophor ist, sondern nur dann, wenn sie zu einer unbesetzten $OH$-Gruppe in die in der zweiten Formel zum Ausdruck gebrachte Beziehung treten kann.

Wenn wir nun erfahren, dass z. B. die Pikrinsäure, ein Derivat des Nitrophenol (Trinitrophenol) in stark saurer Lösung farblos, bei weniger saurer Lösung etwas gelb, in neutraler Lösung stärker gelb, und in alkalischer Lösung (als pikrinsaures Alkali) sogar orange ist, so werden wir daraus schliessen können, dass die Pikrinsäure in Gegenwart von viel überschüssiger Säure die in der Formel I zum Ausdruck gebrachte Constitution eines echten Nitrokörpers mit der Gruppe $NO_2$ hat, dass dagegen in neutraler Lösung ein Teil der Moleküle die andere Form annimmt, und dass bei Gegenwart von Alkalien alle Moleküle nach dem zweiten Typus mit der Gruppe $= NO \cdot OH$, also chinonartig, constituiert sind.

Für die Histologie kommen folgende Farbstoffe in Betracht.

Trinitrophenol = Pikrinsäure

$$C_6 H_2 . OH (NO_2)_3$$

bildet gelbe Blättchen, welche sich in Alkohol leicht, in Wasser etwas schwerer lösen. Ihre Metallsalze sind ebenfalls orange gefärbt. Bei grösserem Überschuss von Alkali ist die Lösung der pikrinsauren Salze tiefer orange als sonst. Bei grossem Überschuss von Salzsäure oder Schwefelsäure ist eine Pikrinsäurelösung farblos. Das Kaliumsalz ist besonders schwer löslich.

Die Pikrinsäure zeichnet sich dadurch aus, dass die Salze, welche sie mit organischen Basen bildet, alle in Wasser fast oder ganz unlöslich sind. Daher geben auch alle basischen Farbstoffe mit Pikrinsäure Niederschläge, und man kann die Pikrinsäure als Reagens darauf benutzen, ob ein zu untersuchender Farbstoff basisch oder sauer ist. Mit sauren Farbstoffen giebt Pikrinsäure natürlich keine Füllung. In Alkohol sind die Pikrate der basischen Farbstoffe besser löslich. Histologisch zeichnet sich die Pikrinsäure durch eine ausgesprochene Affinität zu den haemoglobinhaltigen Blutkörperchen aus, so dass aus einer Mischung von Pikrinsäure mit irgend einem anderen sauren Farbstoff die roten Blutkörperchen stets die Pikrinsäure aufnehmen. In viel weniger ausgesprochenem Masse hat das Protoplasma der anderen Zellen diese Eigenschaft.

Hexanitrodiphenylamin = Aurantia.

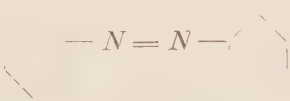
Obwohl das Diphenylamin

$$NH$$

eine Base ist, so erlangt es durch die sechsfache Nitrierung den Charakter einer Säure. Es bildet in Form seines Ammoniumsalzes den gebräuchlichen Farbstoff. Es verhält sich gegen rote Blutkörperchen ähnlich wie die Pikrinsäure.

## 2. Die Azofarbstoffe.

Die chromophore Gruppe der Azofarbstoffe ist $N = N$, das Chromogen ist



Azobenzol,

bei dem einer oder beide Benzolringe durch den Naphthalinkern ersetzt werden können:

$$-N=N-$$

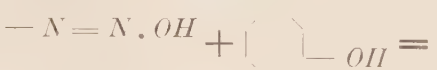
Benzolazonaphthalin.

Ferner giebt es Azofarbstoffe, welche die $N=N$-Gruppe zweimal im Molekül enthalten: Disazo- oder Tetrazofarbstoffe.

Die allgemeine Darstellungsmethode der Azofarbstoffe ist folgende:

Ein aromatisches Amin wird durch salpetrige Säure in eine Diazoverbindung übergeführt („diazotiert"), und dieses bei alkalischer Reaktion an ein Amin oder Phenol „gekuppelt". Z. B.

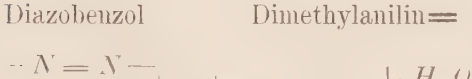
Anilin salpetrige Säure Diazobenzol



Diazobenzol Phenol

Oxyazobenzol
oder

Diazobenzol Dimethylanilin=

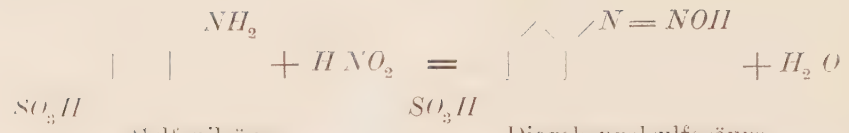


Dimethylamidoazobenzol.

Die Kuppelung mit dem Phenol oder Amin findet stets an der zur Hydroxyl- oder Amidogruppe in Parastellung befindlichen Ecke statt, unter Austritt des an dieser Ecke stehenden *H*-Atoms,[1]) weil dieses infolge der eigentümlichen Constitution des Benzols am labilsten ist. Nur wenn dieses *H*-Atom substituiert ist, findet die Kuppelung an der Orthostelle statt. Ist die Ortho- und die Parastelle besetzt, so ist eine Kuppelung überhaupt nicht möglich.

Um diesen Versuch im Reagensglas zu machen, empfiehlt es sich, um Nebenreaktionen zu vermeiden, nicht das Anilin selbst, sondern seine Sulfosäure, die Sulfanilsäure, zu diazotieren.

[1]) Dieses verbindet sich mit dem *OH* des Diazobenzols zu $H_2O$.



Sulfonilsäure Diazobenzolsulfosäure.

Man füge zu einer Lösung von sulfanilsaurem Natron etwas Natriumnitrit und reichlich *HCl*. Letztere setzt sowohl die Sulfonilsäure wie die salpetrige Säure in Freiheit. Dabei entsteht die Diazobenzolsulfosäure. Dann füge man etwas Phenollösung (oder Naphthol) hinzu und mache mit *Na OH* alkalisch. Es tritt sofort intensive Rotfärbung ein infolge von Bildung von Oxyazobenzolsulfosäure (bezw. Oxynaphthalinazobenzolsulfosäure).

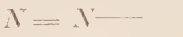
Die Nomenklatur der Azokörper lässt an Klarheit zu wünschen übrig. Z. B. besteht der Gebrauch, wenn zu beiden Seiten der Azogruppe je ein Benzolring (bezw. Naphthalinring) steht, das Wort „Benzol" (bezw. „Naphthalin") nur einmal zu nennen:

Azonaphthalin,

wenn dagegen zwei verschiedene Kerne zu Seiten der Azogruppe stehen, beide zu nennen:

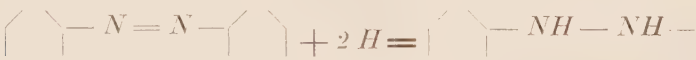


Benzolazonaphthalin,



Benzolazonaphthol.

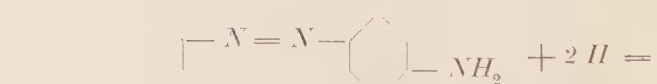
Die Azofarbstoffe sind reduzierbar, und das Ende der Reduktion ist stets die Sprengung des Moleküls, derart, dass jedes *N* der Azogruppe *2 H* addiert. Auf diese Weise entstehen aus 1 Mol. Azokörper 2 Mol. Aminbasen. Eine Zwischenstufe zwischen Azokörper und Aminen sind die Hydrazokörper.



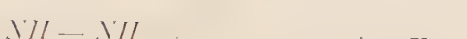
Azobenzol Hydrazobenzol

2 Mol. Anilin

oder:



Amidoazobenzol



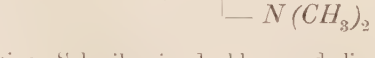
Amidohydrazobenzol

Anilin Paraphenylendiamin.

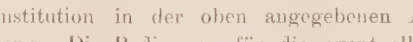
Bei jeder energischen Reduktion tritt die Sprengung der Azogruppe ein. Die Hydrazokörper werden zwar noch durch Oxydation wieder zu den Farbstoffen, aus denen sie hervorgegangen sind; sobald aber die Sprengung der Azogruppe eingetreten ist, lässt sich durch Oxydation der Farbstoff nicht wiederherstellen. Die Azofarbstoffe gehören also zu den nichtverküpenden Farbstoffen.

Schon in der Einleitung hatten wir auf eine Tautomerie der Azokörper mit gewissen Hydrazonen aufmerksam gemacht, so dass man von vorne herein im Zweifel sein könnte, ob man z. B. das Oxyazobenzol

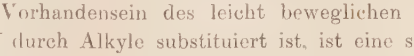
schreiben soll. Es kann nicht geleugnet werden, dass die $N=N$ Gruppe allein dem Molekül Färbung verleiht. Denn z. B. das Azobenzol $C_6H_5N=NC_6H_5$ oder das Dimethylamidoazolbenzol



ist überhaupt nur in der einen Schreibweise denkbar, und diese beiden Körper sind doch gefärbt. Aber diejenigen Körper, welche nach dem Chinontypus geschrieben werden können, sind alle viel stärker gefärbt. Ein sehr lehrreiches Beispiel für diese Thatsache ist folgendes. Phenol kuppelt sich in alkalischer Lösung leicht an Diazobenzol (oder Diabenzolsulfosäure) zu einem tief orangeroten Farbstoff, dem Oxyazobenzol, dessen Constitution in der oben angegebenen Art in doppelter Weise gedacht werden kann. Die Bedingung für die eventuelle Umlagerung in den Chinontypus ist das Vorhandensein des leicht beweglichen $H$ der Hydroxylgruppe. Sobald dieses $H$ durch Alkyle substituiert ist, ist eine solche Umlagerung nicht mehr denkbar. Wenn man z. B. mit Diazolbenzol Phenetol (in alkalisch-alkoholischer Lösung) zusammenbringt, so entsteht



Diazobenzol Phenetol



Oxyazobenzol-Aethyläther

Dieser Körper kann nur auf diese Weise geschrieben werden und nicht als chinonartig aufgefasst werden. In der That entsteht dieser Körper zunächst viel schwerer als das Oxyazobenzol, und zweitens ist er von viel geringerer Tiefe der Färbung. Daraus können wir schliessen, dass die echten Azokörper mit der Gruppe $N=N$ eine geringere Färbung besitzen als ihre tautomeren Hydrazone mit der Gruppe $NH-N$.

Einige Azokörper sind, je nachdem sie sich in saurer oder alkalischer Lösung befinden, stärker oder schwächer gefärbt. Z. B. ist das Dimethylamidoazobenzol (Methylorange) in alkalischer Lösung hellgelb, bei starker Verdünnung kaum sichtbar gefärbt, in saurer Lösung bei gleicher Verdünnung tiefrot. Damit stimmt gut überein, dass die freie Base (also das Methylorange in alkalischer Lösung) nur als echter Azokörper denkbar ist:

$$C_6 H_5 . N = N . C_6 H_4 . N(CH_3)_2,$$

aber in saurer Lösung ebensogut als chinonartig gedacht werden kann:

$$C_6 H_5 . NH . — N = C_6 H_4 . = \overset{V}{N}(CH_3)_2 Cl.$$

Diese leichte Umlagerungsmöglichkeit der Azokörper erklärt die Thatsache, dass viele von ihnen in alkalischer Lösung eine andere Färbung haben als in saurer Lösung.

Wenn aus dem eben Gesagten die Tautomerie der Azokörper mit Hydrazonen aufs Äusserste wahrscheinlich wird, so wird sie zur Gewissheit durch die Thatsache, dass z. B. der aus Diazobenzol + α Napthol entstehende Körper identisch ist mit dem aus Phenylhydrazin + Naphthochinon gebildeten Körper:

I. $C_6 H_5 . N = N . OH + C_{10} H_7 . OH =$

Diazobenzol — Naphthol

$$C_6 H_5 . N = N . C_{10} H_6 . OH + H_2 O$$

II. $C_6 H_5 . NH — NH_2 + \overset{1}{O} = C_{10} H_6 = \overset{4}{O} =$

Phenylhydrazin — Napthochinon

$$C_6 H_5 . NH — N = C_{10} H_6 O + H_2 O.$$

Das Produkt der Reaktion I und das der Reaktion II ist trotz der verschiedenen Formel identisch.

## I. Derivate des Azobenzol.

### A. Amidoderivate.

Der einfachste Repräsentant dieser Gruppe, das Amidoazobenzol

$$— N = N —$$

$$NH_2$$

hat als Farbstoff keine Bedeutung. Dagegen das

$$N(CH_3)_2$$

Dimethylamidoazobenzol, dessen Sulfosäure der unter dem Namen Methylorange vielfach gebrauchte Indikator. In alkalischer Lösung ist es gelb, Ammoniak bewirkt diese Färbung in gleicher Weise wie die fixen Alkalien. In saurer Lösung ist es rot, jedoch sind nur stärkere Säuren, vor allem die Mineralsäuren, im stande, schon in kleinster Menge diesen Umschlag hervorzurufen. Deshalb kann man z. B. Oxalsäure nicht mit Methylorange titrieren. Gegen Kohlensäure ist es ganz unempfindlich, sodass eine Normallauge durch $CO_2$-Absorption ihren Titel bei Anwendung von Methylorange nicht ändern kann.

Das Dimethylamidoazobenzol selbst hat sehr schwach basische Eigenschaften. Sein rotes Chlorhydrat kann z. B. dadurch gespalten werden, dass man seine wässrige Lösung mit Chloroform oder fetten Ölen ausschüttelt. Dann diffundiert die freie gelbe Base in das Chloroform. Die „Lösungsaffinität" zum Chloroform ist also hier grösser als die chemische Affinität zur *HCl*.

Phenylamidoazobenzolsulfosäure,
Tropaeolin *OO*

$$\overset{1}{HSO_3} - C_6H_4 - \overset{4}{N} = \overset{1}{N} - C_6H_4 . \overset{4}{NH} . C_6H_5,$$

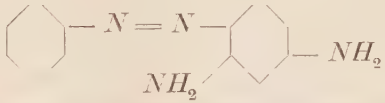
ebenfalls ein Indikator, auch in Mineralsäuren rot, in Alkalien gelb. Da Nichtmineralsäuren den Umschlag ins Rote nicht hervorzubringen vermögen, so dient der Farbstoff auch zum Nachweis der freien *HCl* im Mageninhalt.

Eine entsprechende Metaverbindung ist

$$\overset{1}{HSO_3} - C_6H_4 - \overset{3}{N} = \overset{1}{N} - C_6H_4 . \overset{4}{NH} . C_6H_5,$$

welche als Metanilgelb in der Histologie Verwendung findet.

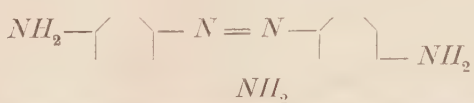
m. Diamidoazobenzol,
Chrysoidin,



ein gelber, heute wenig gebräuchlicher Farbstoff, welcher aber vielleicht deshalb doch nicht ganz vernachlässigt zu werden verdient, weil er in ausgesprochener Weise die Eigenschaft hat, gegen andere dunklere, blaue Farbstoffe substituierend zu färben (vgl. weiter unten).

Noch mehr ist dies der Fall mit dem

Triamidoazobenzol,
Bismarckbraun
(Vesuvin, Phenylenbraun)



Es bildet sich bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf m. Phenylendiamin:

$$\overset{3}{NH_2} . C_6H_4 . \overset{1}{NH_2} + HNO_2 = \overset{3}{NH_2} . C_6H_4 . \overset{1}{N} \quad N . OH + H_2O$$

m. Amidodiazobenzol.

Dieses giebt mit einem weiteren Molekül m. Phenylendiamin durch Kuppelung Bismarckbraun:

$$NH_2 . C_6H_4 . N = N . OH + NH_2 . C_6H_4 . NH_2 =$$
$$\overset{3}{NH_2} . C_6H_4 . \overset{1}{N} = \overset{4}{N} . \overset{3}{NH_2} . C_6H_4 \overset{1}{NH_2}.$$

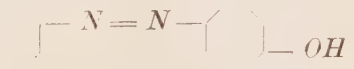
Daher dient das m. Phenylendiamin zum Nachweis der geringsten Spuren salpetriger Säure.

Der Hauptwert des Bismarckbraums liegt darin, dass es, obwohl es eine durchaus deutliche Färbung giebt, immerhin so zart ist, dass es sich vorzüglich als Contrastfärbung gegen einen blauen oder violetten Farbstoff eignet (z. B. bei der Gram'schen Färbung).

Ausserdem eignen sich mit Bismarckbraun gefärbte Objekte gut für die Mikrophotographie.

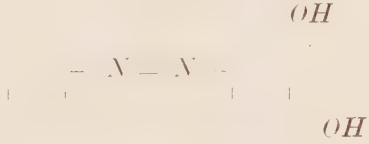
### B. Oxyderivate.

Oxyazobenzol,



der einfachste Repräsentant der Klasse, ist unwichtig, ebenso

Dioxyazobenzol,



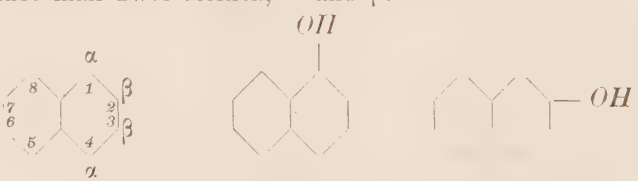
dessen *Na*-Salz durch Fette gespalten wird und dessen Sulfosäure den Farbstoff

Tropaeolin *O*

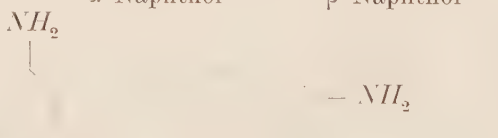
bildet.

### II. Derivate des Benzolazonaphthalins.

Diese Farbstoffe entstehen durch Kuppelung von Diazobenzol und dessen Derivaten mit Naphthol oder Naphthylamin bezw. deren Sulfosäuren. Bei den monosubstituierten Derivaten des Naphthalins unterscheidet man zwei Reihen, α und β:



α Naphthol β Naphthol

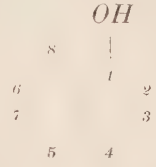


α Naphthylamin β Naphthylamin.

Die α-Derivate kuppeln sich stets an der in Parastellung befindlichen anderen α-Stelle, falls diese besetzt ist, an der Orthostelle. Die

β-Derivate kuppeln sich stets an der in Orthostellung befindlichen α-Stelle.

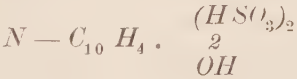
Die Farbstoffe dieser Gruppe sind unerschöpflich, besonders wenn mehrere Sulfosäuregruppen an dem Naphthalinkern hängen. Es giebt allein schon 6 verschiedene α Naphtholmonosulfosäuren:




je nachdem der Sulfosäurerest an der Stelle 2, 3, 4, 5, 7, oder 8 steht; ebensoviele β Naphtholdisulfosäuren. Jeder entspricht eine neue Reihe von Farbstoffen. Es kann daher nicht unsere Aufgabe sein, ein auch nur einigermassen erschöpfendes Bild von dieser Farbstoffklasse zu geben. Die für die Histologie wichtigsten sind:

eine Benzolazo β naphtholdisulfosäure

Orange G




Hierher gehören auch die verschiedenen „Bordeaux".

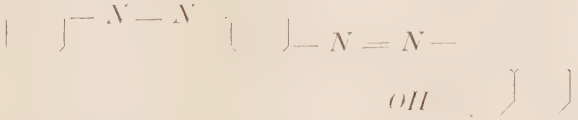
## III. Tetrazofarbstoffe.

Unter Tetrazofarbstoffen versteht man solche Farbstoffe, welche die Azogruppe zweimal im Molekül enthalten. Dabei sind zwei Fälle denkbar:

a) beide Azogruppen sind an denselben Benzolkern gebunden.

Benzolazobenzol-Azoβnaphthol

Sudan III.




Ein ziegelrotes Pulver, welches in Wasser, Alkalien und Säuren gleich unlöslich ist. In concentrierter Schwefelsäure löst es sich mit blauer Farbe. Es ist ferner löslich in Alkohol und in fetten Ölen. Dieser Farbstoff ist wegen seiner fettfärbenden Eigenschaft bekannt, welche auf seiner leichten Löslichkeit in Fetten beruht. Die Fettfärbung mit Sudan ist daher ein schlagender Beweis für die Ausschüttelungstheorie der Färbung. Seine Lösungsaffinität zum Fett ist so gross, dass auch bei der Verfütterung das Fettgewebe sich rot färbt.

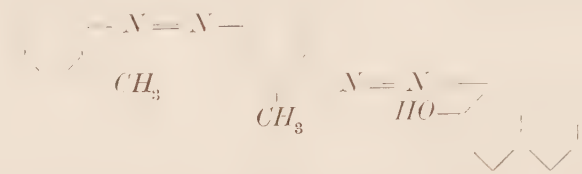
Eine Disulfosäure desselben bildet das

Biebricher Scharlach,

welches wasserlöslich ist und demgemäss kein Fett färbt.

Noch geeigneter für die Fettfärbung, weil von grösserer Farbenintensität, ist

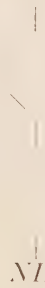
Scharlach R (Fettponceau)
(Azo-orthotuluol-azo-β Naphthol)



Scharlach R und Sudan sind nicht im stande, mit wässeriger Natronlauge Salze zu bilden, sie verhalten sich wie indifferente Farbstoffe. Wohl aber bilden sie mit alkoholischer Natronlauge Salze. Vgl. darüber unter „indifferente Farbstoffe".

b) die beiden Azogruppen sitzen an zwei verschiedenen Benzolkernen.

Die Farbstoffe dieser Gruppe leiten sich ab vom Benzidin:



und heissen deshalb auch

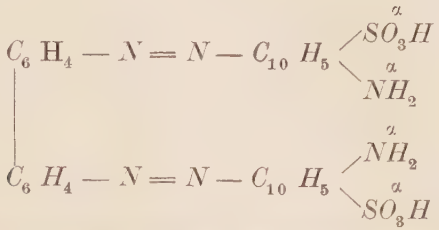
Benzidinfarbstoffe.

Durch Einwirkung von salpetriger Säure entsteht aus dem Benzidin eine Doppel-Diazoverbindung,

an welche sich die verschiedenartigsten Phenole und Amine nebst

ihren Sulfosäuren kuppeln lassen. In der Industrie haben diese Farbstoffe deshalb eine hohe Bedeutung, weil sie schon im neutralen oder alkalischen Bade ohne Beize Baumwolle färben. Ihr wichtigster Repräsentant ist das

Congorot.



Es entsteht durch Kuppelung des soeben genannten Doppeldiazokörpers mit Naphtionsäure =

α Naphthylamin α sulfosäure.

Das Congorot ist daher eine Sulfosäure, ein saurer Farbstoff. Die freie Säure ist tiefblau und in Wasser nur in Spuren löslich, die Salze sind scharlachrot und im Wasser ein wenig leichter löslich. In Alkohol sind die roten Salze besser löslich, und zwar am leichtesten in 50%.

Das Congorot findet vor allem Verwendung als alkalimetrischer Indikator. Am verbreitetsten ist seine Anwendung in Form des „Congopapiers" zum Nachweis der freien Salzsäure im Mageninhalt. Die Reaktion beruht darauf, dass das Congorot durch Säuren infolge von Bildung der freien Congorot-Säure blau gefärbt wird. Aber nur Mineralsäuren bringen den Farbenumschlag schon bei geringstem Überschuss hervor — wie beim Methylorange. Dagegen bewirken organische Säuren, wie Essigsäure, Buttersäure, Propionsäure, Milchsäure den Umschlag erst in viel höherer Concentration, wie sie niemals im Magensaft vorkommen und erzeugen auch kein reines Blau, sondern nur Violett. Dagegen bewirkt eine Spur freier Salzsäure Blaufärbung. Diese Reaktion ist so scharf, dass sie für die Praxis allein zum Nachweis der Salzsäure vollkommen ausreicht.

Aber die Brauchbarkeit des Congorot als Indikator geht noch viel weiter. Es eignet sich vorzüglich für die Titrierung beim Kjeldahl-Verfahren der Stickstoffbestimmung. Die Brauchbarkeit des Congorot für diesen Zweck beruht darauf, dass $NH_3$ ebenso scharf auf dasselbe einwirkt wie die fixen Alkalien. Allerdings ist der Umschlag

in solchen Verdünnungen, wie sie das Kjeldahl-Destillat besitzt, nicht so plötzlich, wie bei Anwendung konzentrierterer Säuren und Laugen. Die blaue Farbe der sauren Lösung geht vielmehr durch alle Töne des Violett in Rot über. Aber darin liegt gerade die Stärke des Farbstoffs. Man kann zunächst, so lange die Flüssigkeit noch rein blau ist, die *NaOH* sorglos zufliessen lassen. Sobald die Flüssigkeit violett ist, beginnt man langsam zu tropfen und lässt solang die Lauge zufliessen, bis die Farbe ganz rein rot, ohne Spur violett ist, was man, bevor man die nötige Übung hat, durch eine Kontrollprobe sicher beurteilen kann. Die Titration lässt sich auf einen Tropfen genau bei $^1/_{10}$ Normallösungen ausführen und wird an Schärfe nach meiner Meinung nur noch von dem Haematein-Umschlag (s. später) übertroffen, ist aber z. B. dem Lakmus, Methylorange und der Rosolsäure bei weitem vorzuziehen. Man benutzt zur Titration etwa 10 Tropfen einer gesättigten Lösung des Farbstoffes in $50\,^0/_0$ Alkohol.

## 3. Die Farbstoffe nach dem Chinontypus.

### a) Indamine und Indophenole.

Diese Farbstoffe sind die einfachsten Repräsentanten der mit Sicherheit nach dem Chinontypus gebauten Farbstoffe.

Ersetzt man in dem Chinon

die beiden *O*-Atome durch die zweiwertige *NH*-Gruppe, so erhält man

Chinondiimid,

welches zwar nicht im freien Zustande, aber in vielen Derivaten existenzfähig ist.

Ein Indamin ist nun ein Chinondiimid, bei welchem das *H*-Atom der einen Imidogruppe durch einen Benzolkern substituiert ist; an welchem seinerseits wieder die mannigfaltigsten Substitutionen Platz greifen können.

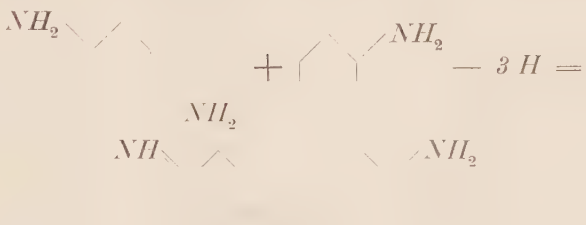
Das einfachste existenzfähige Indamin ist

ein Chinondiimid, bei dem das eine *H* durch Anilin substituiert ist, welches in Parastellung zum $NH_2$ eingreift. Man nennt es schlechtweg „Indamin". Es entsteht durch Oxydation seines Leukokörpers, des Diamidodiphenylamins:

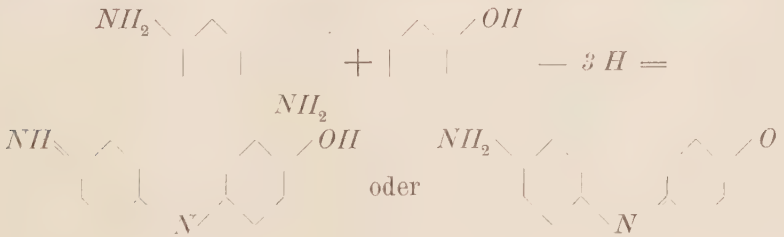
Diamidodiphenylamin

Indamin

oder durch gemeinsame Oxydation von 1 Mol. Paraphenylendiamin und 1 Mol. Anilin:



In derselben Weise entsteht durch gemeinsame Oxydation von 1 Mol. Paraphenylendiamin und 1 Mol. Phenol das einfachste Indophenol:

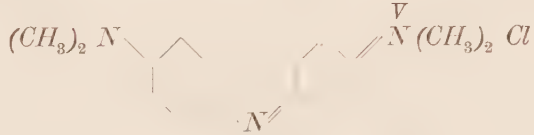


Indophenol.

Das um zwei Methylgruppen reichere Indophenol, welches sich aus einem Benzol- und einem Naphtalinkern zusammensetzt:

dient zur Fettfärbung (Herxheimer). Es ist blau. Seine Salze sind blass rot.

Die Farbstoffe dieser Klasse sind sehr wenig beständig. Schon durch Säuren werden sie unter Chinonentwickelung zersetzt. Es gehören hierhin:

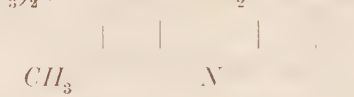


Tetramethylindamin, Bindschedler's Grün.

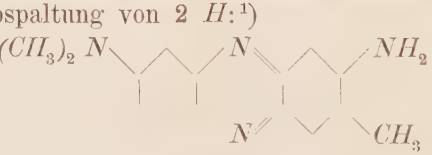
Man kann es sich entstanden denken aus dem salzsauren Indamin.

indem man alle 4 an die *N*-Atome gebundenen *H*-Atome durch Methylgruppen ersetzt. Das in der Formel des Bindschedler'schen Grüns rechts stehende *N*-Atom ist fünfwertig und mit 4 Valenzen an Kohlenstoffradikale (1 Phenyl in Doppelbindung, 2 Methyle) gebunden. Es ist daher das Chlorid einer Ammoniumbase (s. S. 15). Die Ammoniumbase selbst unterscheidet sich von obiger Formel nur dadurch, dass sie statt des *Cl* ein *OH* hat.

Toluylenblau, Amido-dimethyl-tolu-indamin,



ein Dimethyl-Indamin, bei dem ein *H* durch $NH_2$ ersetzt ist, ist weniger an und für sich bemerkenswert, als durch eine wichtige Reaktion, welche es giebt. Beim Erwärmen entsteht aus seiner Lösung nämlich unter Abspaltung von 2 *H*:[1])



Neutralrot,

darüber s. weiter unter Azine.

[1]) Diese *H*-Atome werden nicht frei, sondern werden dazu verbraucht, ein zweites Molekül des Toluylenblau zu seiner Leukoverbindung zu reduzieren.

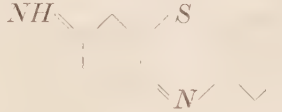
### b) Thiazine und Thiazone.

Diese Farbstoffe unterscheiden sich von den eben genannten dadurch, dass die beiden Benzolkerne ausser durch 1 *N*-Atom noch durch 1 Schwefel-Atom verbunden sind. Dadurch erreicht das Molekül eine grössere Festigkeit, die Farbstoffe sind nicht so leicht zersetzlich wie die Indamine und Indophenole. Sie gehören zu den wertvollsten Farbstoffen, ebenso sehr für die Färbeindustrie, wie für die Histologie.

#### 1. Thiazine.

Der einfachste Repräsentant derselben ist das

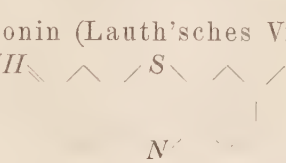
Imidothiodiphenylimid (Thiazim),



nur von theoretischer Bedeutung als einfachster Körper der Klasse.

Dagegen ist sein Amidoderivat, das

Thionin (Lauth'sches Violett)



ein sehr wertvoller Farbstoff. Sein Chlorhydrat ist der gewöhnlich unter obigem Namen benutzte Farbstoff. Es muss aber darauf aufmerksam gemacht werden, dass die Badische Anilin- und Sodafabrik unter dem Namen Thionin einen anderen Farbstoff in den Handel bringt, welchen die chemische Tradition als „Methylenblau" bezeichnet.

Das Thionin (-Chlorhydrat) ist in wässeriger Lösung blauviolett, bei stärkerer Verdünnung reiner blau. Durch *Na OH* wird seine Base in Freiheit gesetzt, welche von rotbrauner Farbe ist und sich in Wasser viel schwerer löst als das Chlorhydrat.

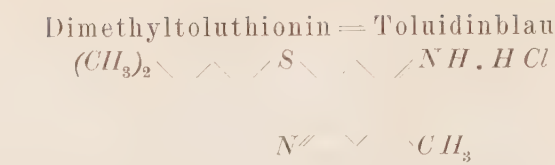
Wir lernen in dem Thionin den ersten der sog. „metachromatisch färbenden Farbstoffe" kennen. Diese haben die Eigentümlichkeit, gewisse Bestandteile der Gewebe mit einer anderen Farbe anzufärben, als ihre wässerige Lösung sie hat. Das Thionin färbt die Kerne blauviolett, Schleim, Knorpel und Mastzellengranula rotbraun bis rotviolett, amyloide Substanz himmelblau.

Substituiert man die beiden *H*-Atome der einen Amidogruppe, so entsteht das

Dimethylthionin,

welches in seinen Eigenschaften dem Thionin sehr ähnlich ist, ferner das

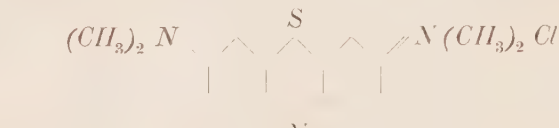
Dimethyltoluthionin = Toluidinblau:



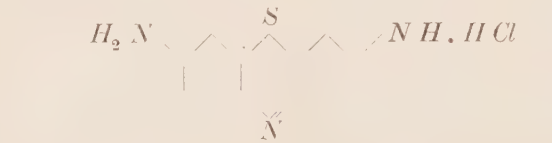
Ein noch weiter substituiertes Thionin ist das

Methylenblau,

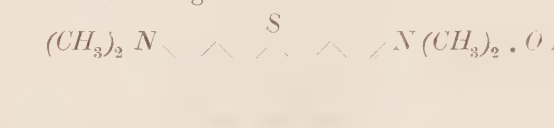
ein Farbstoff, an den in Bezug auf Vielseitigkeit der Verwendung kaum ein zweiter heranreicht. Es ist Tetramethylthioninchlorid.



Es ist also ein salzsaures Thionin,



bei dem alle 4 an *N* gebundenen *H*-Atome durch Methyl-($CH_3$)gruppen substituiert sind. Das in der Formel rechts befindliche *H*-Atom ist 5wertig und nirgends direkt an ein *N*-Atom gebunden. Das Methylenblau ist nach obigen Definitionen (S. 15) also das Chlorid einer Ammoniumbase von folgender Constitution:



Die Ammoniumbasen zeichnen sich vor den einfachen Aminbasen durch ihren stärkeren basischen Charakter aus, so dass sie aus ihren Salzen durch Natron- oder Kalilauge nicht abgeschieden werden können. Darin liegt ein Unterschied vom Thionin, dessen rotbraune Base durch *Na OH* aus seinen violetten Salzen abgeschieden wird. Das Methylenblau wird von Alkalien nicht verändert, wenigstens nicht in diesem Sinne (vgl. jedoch weiter unten). Dagegen kann aus dem Methylenblau durch Behandeln mit feuchtem Silberoxyd die Methylenblaubase abgeschieden werden. Sie ist von ganz gleicher Farbe wie ihre Salze. Das ist ein weiterer Unterschied gegenüber dem Thionin.

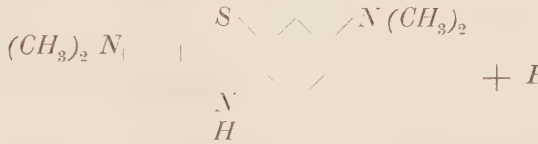
Ferner unterscheidet sich das Methylenblau noch dadurch vom Thionin, dass es fast gar nicht metachromatisch färbt. Mastzellen nehmen mit reinem Methylenblau einen kaum merklich anderen Farbenton an als die Kerne.

Wir haben hier die auffällige Thatsache, dass der höher substituierte Körper (das Methylenblau) weniger metachromatisch färbt als der einfache (Thionin). Bei

einer anderen Farbstoffklasse (den Triphenylmethanfarbstoffen) ist es gerade umgekehrt: der einfache Körper (das Fuchsin) färbt gar nicht metachromatisch, der am höchsten substituierte (das Methylviolett) am besten metachromatisch.

Ein fernerer Unterschied des Methylenblau vom Thionin ist, dass das Methylenblau viel leichter in Wasser löslich ist und ein viel stärkeres Färbevermögen hat. Während Thionin ein sehr reiner Kernfarbstoff ist, tritt beim Methylenblau leichter eine Überfärbung ein, so dass ausser den Kernen auch das Protoplasma sich ziemlich stark mit ihm imbibiert.[1])

Methylenblau ist wie das Thionin, ein sehr leicht reduzierbarer Farbstoff. Schon von normalem Harn werden nach Alkalizusatz in der Wärme ziemlich grosse Mengen reduziert. An der Luft verküpt das Reduktionsprodukt sehr leicht wieder zu Methylenblau. Das Reduktionsprodukt des Methylenblaus ist

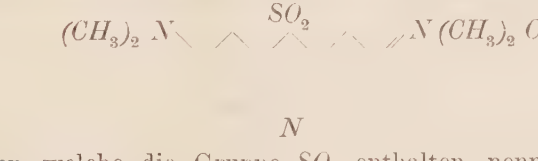


salzsaures Tetramethyldiamidothiodiphenylamin oder Leukomethylenblau (Methylenweiss).

Durch Einwirkung von Alkalien geht das Methylenblau Umwandlungen ein, welche für die Histologie nach verschiedener Richtung von grosser Bedeutung sind. Es sind zum Teil Reduktions-, zum Teil Oxydationsprozesse. Durch Reduktion wird ein Teil des Methylenblaus in Leukomethylenblau umgewandelt.

Die oxydativen Prozesse verlaufen in zweierlei Weise:

a) ein Teil des Methylenblaus wird derartig oxydiert, dass das *S*-Atom zwei *O*-Atome aufnimmt.[2]) Dieser Körper ist das Methylenazur, dessen salzsaures Salz (nach Bernthsen) folgende Constitution hat:



Körper, welche die Gruppe $SO_2$ enthalten, nennt man Sulfone. Das Methylenazur ist also das Sulfon des Methylenblaus.

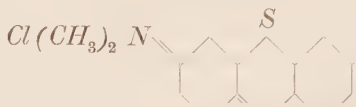
Das Methylenazur ist ein in Wasser ungemein leicht mit blauer Farbe löslicher Farbstoff. Es unterscheidet sich vom Methylenblau vor allem dadurch, dass Alkalien in seiner Lösung einen Farbenumschlag zu rot hervorrufen, indem die freie Base abgeschieden

[1]) In dieser Beziehung wird es allerdings von einigen Triphenylmethanfarbstoffen (Fuchsin, Methylviolett) noch übertroffen.

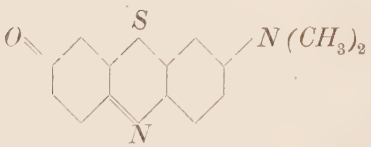
[2]) Hierbei ist der Schwefel 6wertig, wie bei der Schwefelsäure.

wird. Diese ist in reinem Zustand sehr schwierig zu erhalten, vor allem, weil sie begierig Kohlensäure aus der Luft anzieht. Das Carbonat löst sich mit blauer Farbe in Wasser und wird durch *Na OH* wiederum in die freie Farbbase verwandelt. Die ätherische Lösung der Base ist rot, die alkoholische violettrot.

b) ein zweiter Teil des Methylenblaus wird derartig verändert, dass unter Abspaltung von Dimethylamin die eine Dimethylamidogruppe durch ein *O*-Atom ersetzt wird:




$+ H_2 O =$



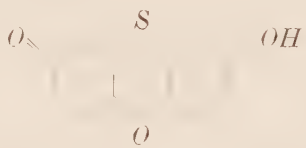

$+ N(CH_3)_2 H . HCl$
salzsaures Dimethylamin.

Methylenviolett.

Es ist sowohl in Form des Chlorhydrats wie der freien Base in Wasser schwer, ersteres mit graublauer Farbe löslich; in warmer *HCl* löst es sich besser. Die Base löst sich in Alkohol mehr violett mit prachtvoller rotbrauner Fluorescenz, in Chloroform (schwerer in Äther) mit himbeerroter Farbe.

Die Trennung des Methylenvioletts vom Methylenazur beruht auf der Thatsache, dass das Leukomethylenviolett infolge seines phenolartigen Charakters in Äther löslich ist, das Leukoazur dagegen nicht.

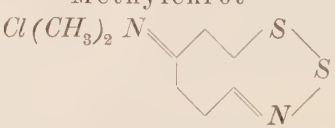
Das Methylenviolett zersetzt sich bei anhaltendem Kochen mit Alkalien weiter zu Thionol




unter nochmaliger Abspaltung von Dimethylamin.

Bei dieser Gelegenheit muss noch ein Farbstoff erwähnt werden, welcher zwar kein Zersetzungsprodukt des Methylenblaus ist, aber bei dessen Fabrikation unter gewissen Bedingungen gleichzeitig entsteht und das Methylenblau verunreinigen kann, das

Methylenrot

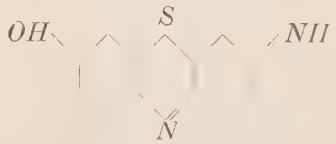



Man erkennt den Gehalt des Methylenblaus an Methylenrot daran, dass die wässerige Lösung, auf Fliesspapier getropft, ein blaues Centrum

und einen roten peripheren Saum hinterlässt. Dieser Farbstoff ist aber nur in sauren Lösungen, in Form der Salze, haltbar, während es durch Alkalien sofort zerstört wird. Selbst kohlensaure und phosphorsaure Alkalien zerstören ihn. Nachträglicher Zusatz von Säure stellt das Methylenrot dann nicht wieder her. Das ist deshalb äusserst wichtig, weil daraus hervorgeht, dass eine alkalihaltige Methylenblaulösung niemals Methylenrot enthalten kann, was von einigen Histologen übersehen worden ist.

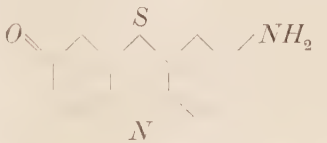
### 2. Thiazone.

Die Thiazone unterscheiden sich von den Thiazinen dadurch, dass sie statt einer Amidogruppe eine Hydroxylgruppe enthalten. Sie stehen also zu den Thiazinen in demselben Verhältnis, wie die Indophenole zu den Indaminen.



Thionolin

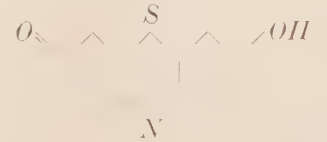
ist identisch mit folgendem Thiazin:



und entsteht durch Behandeln des Thionins mit Kalilauge, in derselben Weise wie das Methylenviolett aus dem Methylenblau entsteht, indem die Imidogruppe durch ein *O*-Atom ersetzt wird.

Durch längeres Kochen mit Kalilauge wird auch die zweite Amidogruppe als $NH_3$ abgespalten und es entsteht

Thionol.



Das Thionolin ist nach seiner ersten Formel ein schwach saurer, nach seiner zweiten Formel ein basischer Farbstoff. Das Thionol ist auf jeden Fall ein saurer Farbstoff.

In geringen Mengen entsteht das Thionol auch bei anhaltendem Kochen von Methylenblau mit Kalilauge.

Auch das Methylenviolett kann man zu den Thiazonen rechnen, da es nichts weiter ist als ein Dimethyl-Thionolin.

### c) Oxazine und Oxazone.

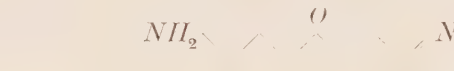
Die Oxazine und Oxazone enthalten statt des *S*-Atoms der Thiazine und Thiazone ein *O*-Atom. Sie zeichnen sich alle durch eine intensive, prachtvolle rotbraune Fluoresceuz aus, welche sie noch in den verdünntesten Lösungen zeigen.

#### 1. Oxazine.

Es wird eine grosse Reihe derartiger Farbstoffe fabriciert, welche sich ziemlich wenig von einander unterscheiden. Der beste von ihnen scheint das

Kresylviolett *RR*

zu sein, welches die Constitution hat:



Er löst sich mit blauvioletter Farbe und intensiver rotbrauner Fluorescenz in Wasser. Durch Alkalien wird die braune Base abgeschieden. Es hat stark metachromatische Eigenschaften.

Die Farbwerke Mühlheim fabricieren noch andere „Cresylviolett"-Marken, deren Constitution ich nicht in Erfahrung bringen konnte. Zum Teil haben sie ähnliche Eigenschaften wie das beschriebene. Sehr geeignet scheint das „Brillant-Cresylblau" derselben Fabrik zu sein.

#### 2. Oxazone.

Die Oxazone unterscheiden sich von den Oxazinen in derselben Weise, wie die Thiazine von den Thiazonen, wie die Indamine von den Indophenolen.

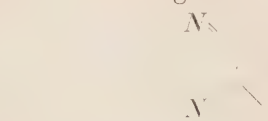
Resorufin,

ein in Alkalien leicht mit rosaroter Farbe und zinnoberroter Fluorescenz löslicher Farbstoff.

### d) Azine.

Das Chromogen dieser Farbstoffklasse ist das Phenazin,

eine Formel, welche man ebenso gut so schreiben kann:



In der zweiten Formel tritt der Orthochinontypus des Moleküls hervor. Da man im einzelnen Fall nicht entscheiden kann, auf welcher Seite des Moleküls die Doppelbindungen liegen, so ziehen wir der Einfachheit halber die erste Schreibweise im folgenden vor.

Je nachdem aus diesem Chromogen der Farbstoff durch Hinzutreten einer Amido- oder einer Hydroxylgruppe entsteht, spricht man Amidoazinen (Eurhodinen) oder Oxyazinen (Eurhodolen).

1. Eurhodine

symmetr. Diamdiophenazin,

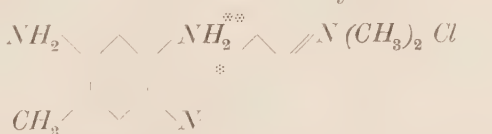
ist schwierig zu erhalten und unterscheidet sich nur wenig von dem folgenden Farbstoff.

Dimethyldiamidotoluphenazin[1]),

eine Farbbase, deren salzsaures Salz den Namen

Neutralrot[2]) oder Toluylenrot führt.

Es entsteht durch Erhitzen des Toluylenblau



eines amidierten Indamins, indem die mit * bezeichneten *H*-Atome austreten. Eins von diesen geht an das *Cl*, die beiden anderen werden nicht frei, sondern reduzieren in statu nascendi ein anderes Molekül des Toluylenblaus zu seiner Leukoverbindung.

[1]) Anm. „Tolu“ drückt aus, dass auf der einen Seite nicht der gewöhnliche Benzolkern, sondern seine nächst höhere homologe Verbindung steht, das Monomethylbenzol = Toluol.

[2]) Der Name Neutralrot ist insofern irreführend, als man annehmen könnte, es handle sich um einen neutralen Farbstoff. Das Neutralrot ist aber natürlich ein basischer Farbstoff.

Das Neutralrot ist ein in Wasser sehr leicht löslicher, in 0,85% Kochsalzlösung viel schwieriger löslicher Farbstoff, dessen Nuance je nach dem Alkalescenzgrade der Lösung wechselt. In genau neutraler Lösung (Lösung des salzsauren Salzes in reinem Wasser) ist er ziegelrot. Durch einen geringen Überschuss von Säure wird er fuchsinrot, durch einen grösseren Säureüberschuss wird er blau. Das kommt daher, dass bei Gegenwart von viel Säure sich auch die zweite Amidogruppe absättigt. Das Neutralrot bildet ein blaues zweisäuriges Salz. Eine Verdünnung mit Wasser reicht aber hin, um dieses wieder zu dissoziieren. Wenn man die blaue Lösung des Neutralrots in starker Salzsäure mit Wasser verdünnt, wird sie rot.

Alkalien setzen die Base des Neutralrots in Freiheit. Sie ist von gelber Farbe und viel schwerer löslich als ihre Salze. In verdünnten Neutralrotlösungen bewirkt daher ein Zusatz von Natronlauge nur einen Farbenumschlag ins Gelbe, in stärkerer Lösung eine gelbbraune Fällung.

Die Empfindlichkeit der neutralen Neutralrotlösung gegen Alkalien und Säuren wird kaum von einem anderen Farbstoff erreicht. Wenn sonst ein Indikator sehr empfindlich ist gegen schwache Basen, so pflegt er gegen schwache Säuren etwas unempfindlich zu sein, z. B. das Congorot. Ist er aber gegen schwache Säuren ($CO_2$) empfindlich, so pflegt er gegen schwache Alkalien unempfindlich zu sein, z. B. das Phenolphtaleïn. Das Neutralrot ist in gleicher Weise hochempfindlich gegen die schwächsten Säuren, selbst Kohlensäure, und gegen die schwächsten Alkalien. So wird z. B. eine neutrale, verdünnte Neutralrotlösung, welche in einem Glasgefäss aufbewahrt wird, mit der Zeit gelb infolge des Alkalis, welches mit der Zeit aus dem Glase gelöst wird; andererseits wird eine eben leicht alkalisch gemachte Neutralrotlösung an der Luft durch Aufnahme von Kohlensäure wieder rot. Diese ausserordentliche doppelseitige Empfindlichkeit macht das Neutralrot ungeeignet zum Indikator bei der alkalimetrischen Titration.

Das Neutralrot hat bei der Färbung lebender Objekte eine durch keinen anderen Farbstoff ersetzbare Bedeutung, wie von Ehrlich nachgewiesen ist. Es hat zu einer grossen Zahl von Zellkörnchen eine „maximale Verwandtschaft". Es zeichnet sich dabei durch ausserordentliche Ungiftigkeit aus. Man kann Wassertiere in einer dünnen Neutralrotlösung ohne Schaden leben lassen. Seine Empfindlichkeit gegen Säuren und Alkalien machen es in der Biologie zu dem vorzüglichsten Indikator.

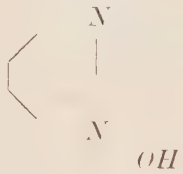
### 2. Eurhodole.

Diese Farbstoffe sind für die Histologie wie für die Industrie ohne Bedeutung.

### e) Azoniumbasen oder Safranine.

Diese Farbstoffe reihen sich an die Azine unmittelbar an. Das eine *N*-Atom des Phenazins wird fünfwertig, und von den beiden hinzugekommen Valenzen ist die eine an einen Benzolkern, die andere an einen einwertigen Säurerest gebunden. Ebenso wie aus einer Aminbase durch Hinzutreten eines Kohlenstoffradikals und eines Säurerestes eine Ammoniumbase wird, wird hier aus dem Azin eine „Azoniumbase".

Das Chromogen der Safranine ist das
Phenylazoniumhydroxyd

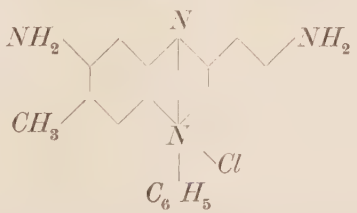


Das einfachste Safranin ist dementsprechend das
Diamidophenazionumhydroxyd bezw. -chlorid:

oder schlechtweg Safranin.

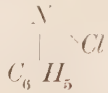
Es stellt einen sehr wertvollen, roten Farbstoff dar, welcher entsprechend seiner Eigenschaft als Ammoniumbase, durch *NaOH* nicht verändert wird.

Seine Homologen sind entweder in einem der beiden zum Phenazin gehörigen Benzolkerne substituiert



Tolusafranin

oder in der Amidogruppe, z. B.



Diamidosafranin.

Ebenso giebt es Di-, Tetraamidopheno- und tolusafranin, welche um so violettstichiger sind, je mehr Methyl- oder Aethylgruppen sie enthalten.

ROSS-WHITNEY MEDICAL LIBRARY SEP 28 1916

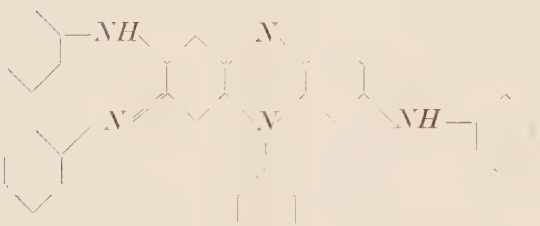
Die in der Amidogruppe durch Phenylreste substituierten Safranine stellen die Mauveine dar und gehören zu den am längsten bekannten künstlichen Farbstoffen.

Mit den Safraninen in engster Beziehung stehen ferner die

Induline,

deren Constitution jedoch noch nicht sicher aufgeklärt ist.

Nur soviel steht fest, dass die Basen der Induline derartige Constitutionsformeln haben:



Sie sind also phenylierte und amidierte Safranine. Den Reichtum an Benzolkernen und gleichzeitig Amidogruppen haben sie mit dem

Triphenylrosanilin (s. S. 60) gemein. Sie teilen mit ihm daher auch ihre Unlöslichkeit in Wasser. Ihre Sulfosäuren sind wasserlöslich.

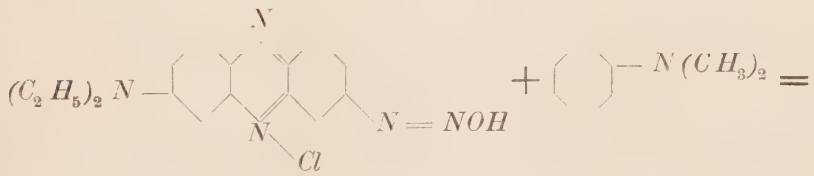
Es giebt also sowohl basische wie saure Induline. Sie sind von violetter bis schwarzer Farbe. In der Histologie am gebräuchlichsten sind zwei Sulfosäuren,

Indulin und Nigrosin.

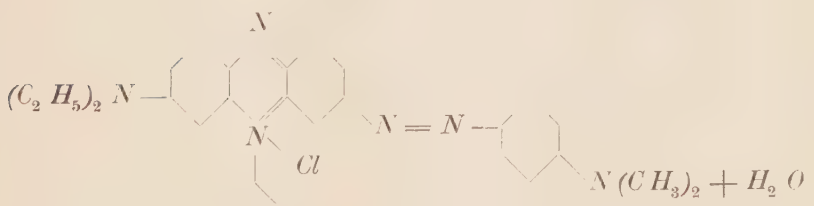
Ferner leiten sich vom Safranin die

Safraninazofarbstoffe

ab, welche vielleicht in Zukunft eine grössere Rolle in der Histologie spielen werden als bisher. Wenn man nämlich auf Safranin salpetrige Säure einwirken lässt, so wird die eine der beiden Amidogruppen in die Diazogruppe verwandelt. An diese lässt sich nun wiederum nach den bei den Azofarbstoffen abgehandelten Grundsätzen ein Phenol oder ein Amin kuppeln. Z. B.:

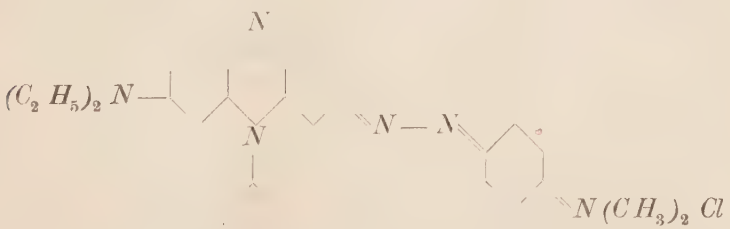


Diazo-Diaethylsafranin Dimethylanilin



Diazingrün

oder wahrscheinlich



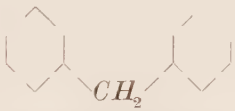
Diaethylsafraninazodimethylanilin.

Dies ist ein graugrüner, leicht löslicher Farbstoff von ganz eigenartiger Eigenschaft bei der vitalen Färbung. Er kommt unter dem Namen Diazingrün[1]) oder Janusgrün[2]) in den Handel.

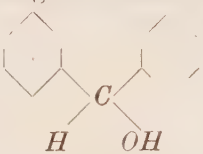
### f) Diphenylmethanfarbstoffe.

Die Grundsubstanz, von der sich theoretisch diese Farbstoffe ableiten, ist das

Diphenylmethan.

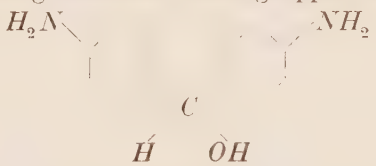


Das eigentliche Chromogen ist aber der sekundäre Alkohol[3])



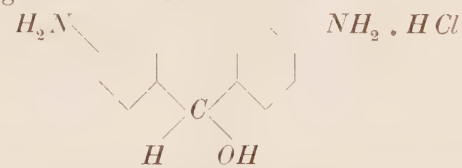
Benzhydrol.

Durch Einführung von zwei Amidogruppen in dieses erhält man

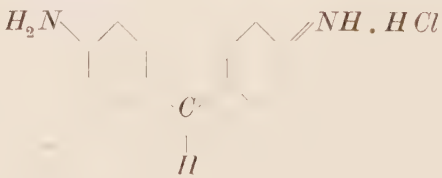


p. Diamidobenzhydrol,

ein farbloser Körper mit basischen Eigenschaften. Sein salzsaures Salz, welches eigentlich die Constitution



haben sollte, lagert sich im Augenblick des Entstehens unter Austritt von $H_2O$ um:



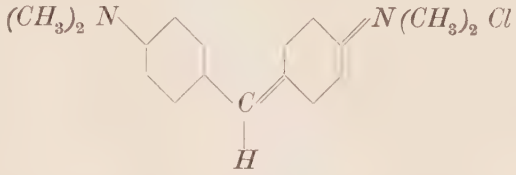
[1]) Kalle & Co., Biebrich.

[2]) Höchster Farbwerke.

[3]) Alkohole mit der Gruppe $CH_2OH$ sind primäre, mit der Gruppe $CH.OH$ sekundäre, mit der Gruppe $C.OH$ tertiäre.

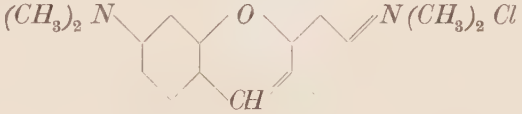
In dieser Formel fällt sofort die parachinonartige Doppelbindung auf. Die Formel ist nichts weiter als ein Indamin, bei dem das die beiden Benzolkerne bindende *N*-Atom durch = *CH* ersetzt ist. Dem entsprechend ist dieser Körper auch ein Farbstoff.

Sein Tetramethylderivat:




stellt das Auramin dar.

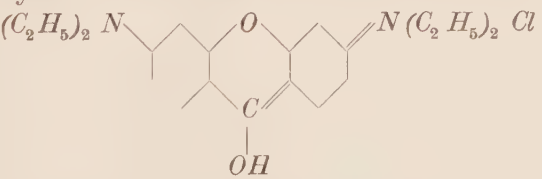
Von diesem kann man theoretisch folgenden, sehr eigenartigen Farbstoff ableiten:




Pyronin,

welches sich in seiner Constitution von den Oxazinen nur dadurch unterscheidet, dass es *CH* statt *N* hat. Es teilt mit den Oxazinen auch die Eigenschaft prachtvoller Fluorescenz. Es ist in Lösung rot und fluoresciert gelb, ähnlich dem Eosin. Dieser Farbstoff kommt als Pyronin G in den Handel, während der an Stelle der vier Methyl- vier Aethylgruppen enthaltende Körper Pyronin B heisst.

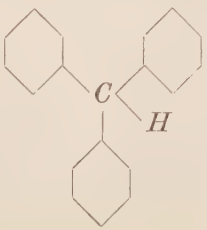
Durch Oxydation des letzteren entsteht das Acridinrot.




### g) Triphenylmethanfarbstoffe.

#### A) Rosanilinreihe.

In derselben Weise, wie die eben genannten Farbstoffe vom Diphenylmethan, leiten sich die folgenden Farbstoffe von Triphenylmethan ab. Also:

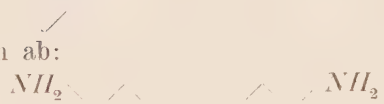



Triphenylmethan.

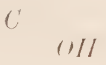
Sein tertiärer Alkohol ist

Triphenylcarbinol.

Von ihm leitet sich ab:

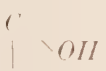


I.



Diamidotriphenylcarbinol

II.



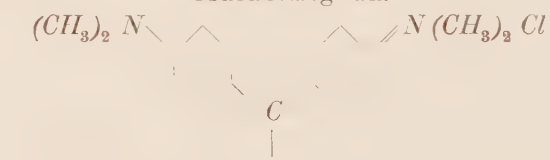
Triamidotriphenylcarbinol.

## I. Derivate des Diamidotriphenylcarbinol.

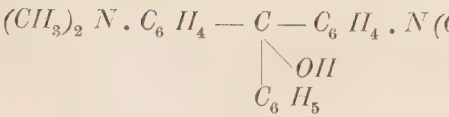
Wie bei den Diphenylmethanfarbstoffen tritt in den Salzen des Diamidotriphenylcarbinol unter Austritt von $H_2O$ eine chinonartige Doppelbindung und damit Farbstoffcharakter auf.

Der wichtigste Farbstoff dieser Gruppe ist das

Malachitgrün.

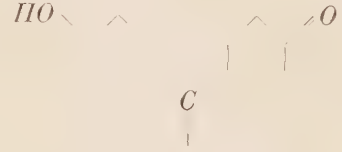


Aus seiner wässerigen, grünen Lösung wird durch $NaOH$ die Farbbase in Freiheit gesetzt, welche sich sofort in die farblose Carbinolbase



umwandelt.

Werden im Malachitgrün die Dimethylamidogruppen durch *OH*-Gruppen ersetzt, so entsteht

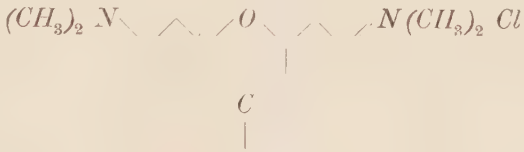


Benzaurin,

ein in Wasser unlöslicher, in Akohol mit gelber Farbe löslicher Farbstoff, dessen Alkalisalze violett sind.

Wie das Pyronin zum Auramin, so verhält sich zum Malachitgrün das

Rosamin.



## II. Derivate des Triamidotriphenylcarbinol.

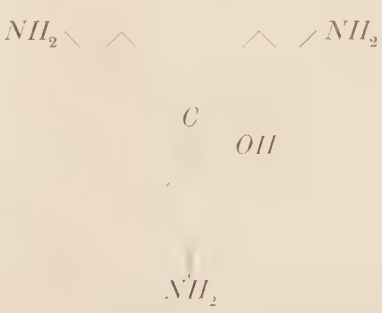
Die beiden wichtigsten Basen dieser Gruppe sind erstens das

Triamidotriphenylcarbinol

selbst, welches auch den Namen

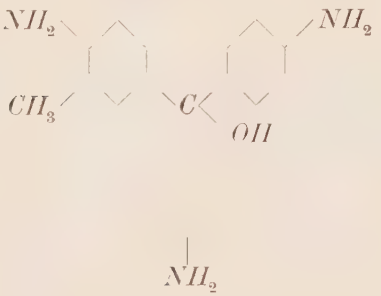
Pararosanilin

führt:



und zweitens das

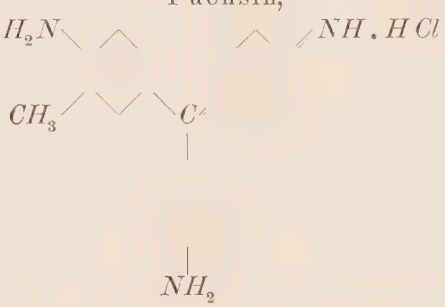
Triamido-diphenyl-tolu-carbinol oder
Rosanilin



Diese Basen sind ungefärbt und lagern sich bei der Salzbildung in derselben Weise um, wie die Carbinolbasen der vorigen Klasse es thun.

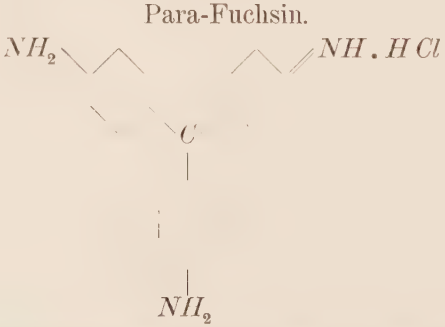
Das salzsaure Rosanilin lagert sich daher sofort bei der Entstehung aus Rosanilin und Salzsäure um zu

Fuchsin,



ein schon sehr lange bekannter, in Wasser etwas schwer löslicher Farbstoff von intensiv roter Farbe und starkem Färbevermögen. Besser als das salzsaure Rosanilin ist das essigsaure Rosanilin löslich. Durch einen Überschuss an Mineralsäure werden unter Gelbfärbung auch die anderen Amidogruppen abgesättigt. Das käufliche Fuchsin enthält neben dem salzsauren Rosanilin auch salzsaures Pararosanilin,

Para-Fuchsin.



Das Fuchsin ist ein basischer Farbstoff, kann aber durch Hinzu-

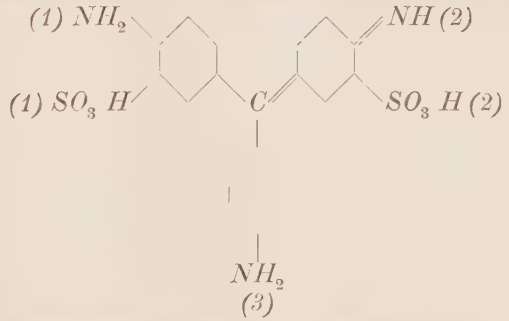
treten einer oder mehrerer Sulfosäuregruppen in einen sauren Farbstoff umgewandelt werden. So ist z. B.

Säurefuchsin oder
Fuchsin *S*

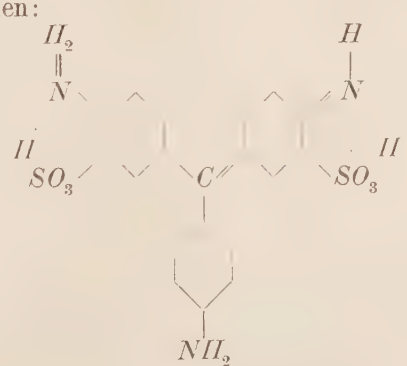
ein saures Salz einer Rosanilindisulfosäure.

Dieser Farbstoff zeichnet sich durch seine ganz ungemein leichte Löslichkeit in Wasser aus. Seine rote wässerige Lösung wird durch Alkali, bei genügender Verdünnung selbst durch das Alkali des Brunnenwassers allmählich entfärbt, indem sich das neutrale Salz der Disulfosäure bildet. Säuren stellen die Farbe wieder her. Dieser Umschlag erfolgt aber sehr träge, so dass das Säurefuchsin als Indikator nicht zu brauchen ist. Der Umschlag beruht, wie beim Fuchsin, darauf, dass in saurer Lösung das Molekül die chinonartige Struktur besitzt, in alkalischer Lösung eine einfache sulfonierte Carbinolbase ist. Daher lassen sich mit Säurefuchsin gefärbte Schnitte durch schwache Säuren nicht entfärben, sondern umgekehrt, in saurer Lösung wird die Färbung sogar intensiver, während mit Säurefuchsin gefärbte Schnitte sich in Leitungswasser allmählich entfärben.

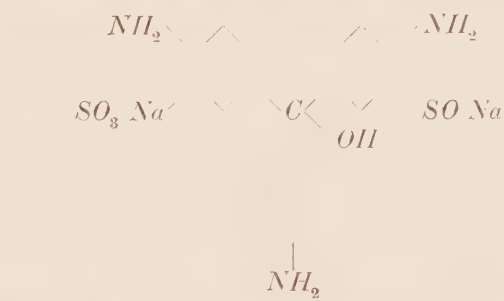
Die Ursache des Farbenumschlags des Säurefuchsins, je nachdem es in saurer oder alkalischer Lösung ist, hat man sich folgendermassen zu denken. Dem Säurefuchsin kommt etwa folgende Formel




zu, wenigstens in saurer Lösung. Die beiden mit (1) bezeichneten Gruppen, ebenso die mit (2) bezeichneten werden dabei eine innere Salzbildung eingehen:



Fügt man $NaOH$ hinzu, so wird zunächst in der mit (1) bezeichneten $SO_3H$-Gruppe das $H$ durch $Na$ ersetzt. Das thut dem Farbstoffcharakter des Moleküls keinen Abbruch. Das ist das saure Salz des Säurefuchsins. Ein zweites Molekül $NaOH$ sättigt die mit (2) bezeichnete $SO_3H$-Gruppe ab, indem sie die innere Salzbildung mit der $NH$-Gruppe aufhebt. Wie nun beim Fuchsin, so ist auch beim Säurefuchsin die freie $= NH$-Gruppe nicht beständig, und unter Aufnahme von $H_2O$ wandelt sich der Körper in die sulfonierte Carbinolbase

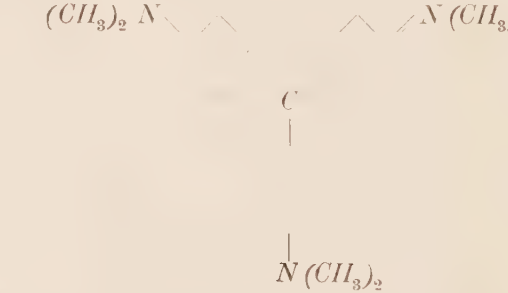


um, unter Verlust der chinonartigen Struktur und damit auch des Farbstoffcharakters.

Wenn die $H$-Atome der Amidogruppen des Fuchsins durch Methylgruppen substitutiert werden, so wird der Farbenton violetter, umsomehr, je mehr Methylgruppen eingeführt sind. Auf diese Weise entstehen:

Rotviolett 5 BB, ein mehrfach (4? 5?) methyliertes Rosanilin,
Rotviolett 5 R, Dahlia, ein mehrfach aethyliertes Rosanilin,
Methylviolett B, Gemenge von Tetra-, Penta- und Hexamethylpararosanilin,
Kristallviolett, Hexamethylpararosanilin,
Aethylviolett, Hexaaethylpararosanilin u. s. w.
Auch Gentianaviolett ist ein Methylviolett, welches neben Hexa- noch Penta- und Tetramethylpararosanilin enthält.

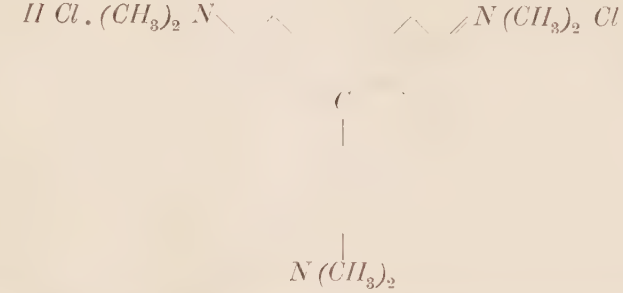
Methylviolett, (Hexamethylpararosanilin)[1]) ist einer der



[1]) Methylviolett ist somit kein unmittelbares Derivat des Fuchsins; denn dieses ist ein Salz des Rosanilins, das Methylviolett leitet sich dagegen vom Pararosanilin ab.

intensivsten Farbstoffe. Durch Alkali wird seine Lösung allmählich entfärbt, aus derselben Ursache wie beim Fuchsin.

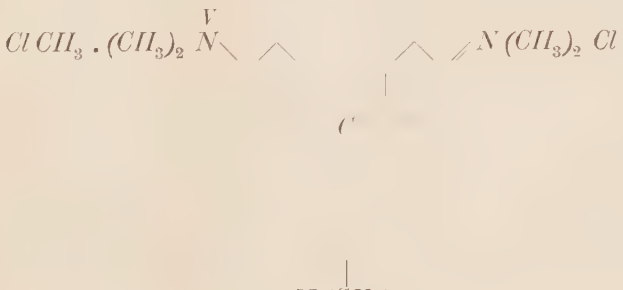
Ein Überschuss von *HCl* färbt eine dünne Methylviolettlösung zunächst blau, dann grün. Der grüne Farbstoff ist ein Methylviolett, bei dem auch eine zweite Dimethylamidogruppe durch *HCl* abgesättigt ist, also:



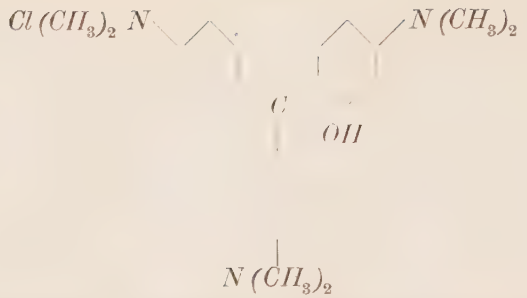
Die blaue Lösung stellt eine Zwischenstufe dar, bei der ein Teil der Moleküle als violettes, einsäuriges Salz, der andere Teil als grünes zweisäuriges Salz vorhanden ist. Das zweisäurige Salz ist nur bei einem Überschuss einer Mineralsäure beständig. Sinkt der Gehalt der Lösung an Säure unter eine gewisse Concentration, so zerfällt das grüne zweisäurige Salz sofort in das violette einsäurige und freie Säure. Deshalb wird die grüne Lösung beim blossen Verdünnen mit Wasser erst blau, dann violett.

Man kann jedoch auch ein beständiges zweisäuriges Salz des Methylvioletts gewinnen, wenn man es nicht durch einen Überschuss von Chlorwasserstoff, sondern von Chlormethyl darstellt. Dadurch wird die zweite Dimethylamidogruppe in eine Ammoniumbase verwandelt. Dieses Chlormethylat des Methylvioletts ist das

Methylgrün



Durch Alkalien wird es, wie auch die anderen Triphenylmethanfarbstoffe, unter Bildung einer Carbinolbase



entfärbt.

Das zweisäurige, grüne Salz des Methylvioletts wird durch einen noch grösseren Überschuss von Mineralsäure in das schwach gelb gefärbte, dreisäurige Salz übergeführt, welches beim Verdünnen mit Wasser zunächst in das zweisäurige Salz + 1 Mol. freie Säure, und bei weiterem Verdünnen in das einsäurige violette Salz + 2 Mol. freie Säure gespalten wird.

Aus dem Methylviolett wird ein grüner Farbstoff, wenn die basischen Eigenschaften der zweiten Dimethylamidogruppe vernichtet werden, und zwar

a) entweder durch Überschuss von *H Cl* (zweisäuriges Salz des Methylvioletts)

b) durch Chlormethyl (Methylgrün)

c) durch Entfernung der ganzen $N(CH_3)_2$-Gruppe (Malachitgrün),

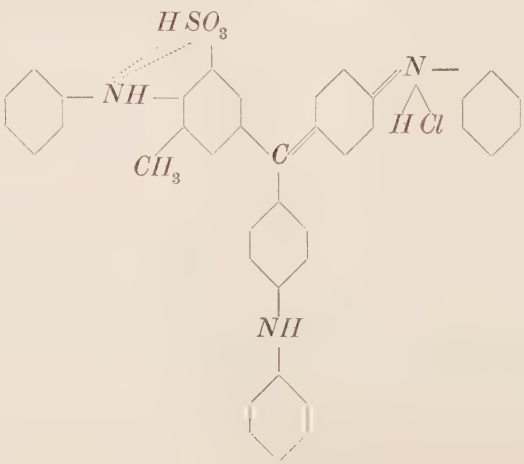
Ein Triaethylrosanilin-Jodhydrat ist das „Jodviolett", von dem sich durch Addition von Jodmethyl das Jodgrün herleitet, in derselben Weise wie vom Methylviolett das Methylgrün.

Werden im Rosanilin einzelne *H*-Atome der Amidogruppen durch Benzolkerne substituiert, so entstehen Farbstoffe, welche man unter dem Namen Anilinblau zusammenfasst. Je nach der Zahl der substituierenden Phenylgruppen ist der Farbenton violett bis rein blau. Der am meisten phenylierte Farbstoff enthält drei Phenylgruppen. Unter demselben Namen kommen aber auch die Sulfosäuren derartiger Farbstoffe in den Handel. Insbesondere bezeichnet man das Natronsalz der Monosulfosäure des Triphenylrosanilins als Alkaliblau.

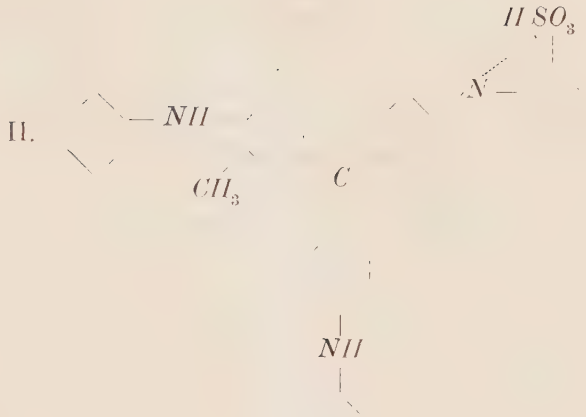
Es bedarf einer eingehenderen Besprechung.

Das Alkaliblau hat in saurer Lösung gemäss seiner Entstehungsweise entweder die Constitution

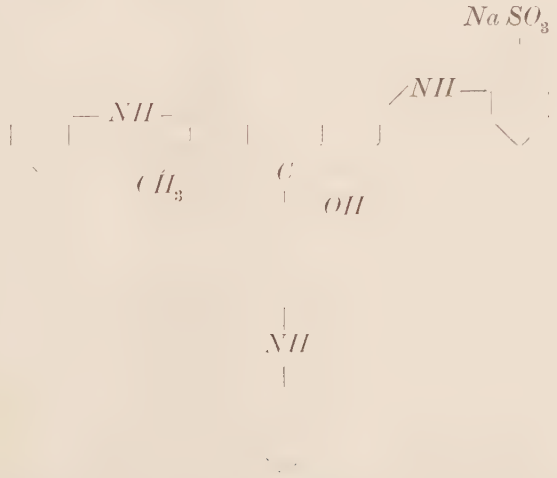
I.



oder




d. h. die Sulfosäure befindet sich entweder an der Seite der chinonartigen Doppelbindung (II) oder an einer der beiden anderen Seitenketten (I). Zwischen der Sulfosäuregruppe und der benachbarten $— NH —$ bezw. $= N —$ Gruppe wird dabei eine innere Salzbildung eintreten, ähnlich wie beim Säurefuchsin. In alkalischer Lösung wird zunächst, bei geringer Menge von $NaOH$, diese innere Salzbildung aufgehoben und es bildet sich das Natronsalz der Sulfosäure. Für die Formel I hat dies auf den Farbcharakter des Moleküls keinen Einfluss, dagegen bei der Formel II bewirkt die Freimachung der $= NH$-Gruppe in derselben Weise wie beim Fuchsin und beim Säurefuchsin die Verwandlung des Moleküls in die entsprechende Carbinolbase:




Diese ist ungefärbt.

Das käufliche Alkaliblau ist das Natronsalz der Monosulfosäure.

Seine blaue Lösung wird durch Zusatz von *HCl* viel intensiver blau. Daraus kann man schliessen, dass es sowohl den Körper I wie II, beide als Natronsalz, enthält. Das Salz I ist blau, das Salz II ist farblos. Durch Zusatz von *HCl* wird auch das Salz II blau.

Nun färbt man in der Industrie mit Alkaliblau nicht wie sonst bei sauren Farbstoffen aus saurem, sondern aus alkalischem Bade, so dass die nach II constituierten Moleküle des Farbstoffs in Form des farblosen Natronsalzes aufgenommen werden. Daher wird die Färbung auch zunächst sehr matt. Nach beendeter Färbung wird die Farbe aber durch ein Säurebad „aviviert“; dann erst tritt die Färbung in voller Intensität ein. Offenbar wird jetzt das farblose Natronsalz II in die blaue freie Sulfosäure II verwandelt.

Die Färbung nimmt man nicht gleich aus saurer Lösung vor, weil die $HSO_3$-Gruppe in saurer Lösung durch innere Salzbildung gebunden ist, und nicht wie bei anderen sauren Farbstoffen durch die Säure in Freiheit gesetzt wird. Daher tritt der saure Charakter des Alkaliblau in saurer Lösung nicht so sehr hervor.

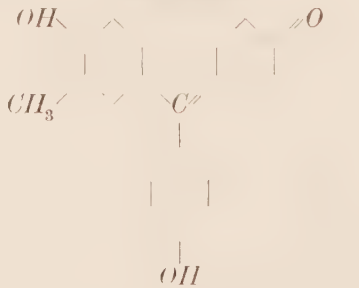
Sobald sich aber noch eine zweite Sulfosäure-Gruppe im Molekül befindet, verhält sich der Farbstoff stets und in jeder Beziehung wie ein echter, saurer Farbstoff.

Derartige Farbstoffe sind z. B. Bayrisch-Blau, Wasserblau, Triphenylrosanilindisulfosäure, und China blau, Triphenylrosanilintrisulfosäure.

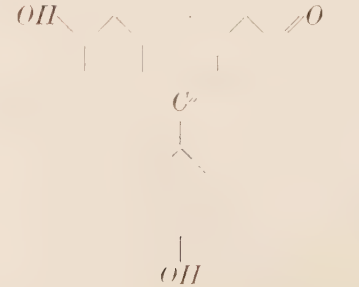
### B) Rosolsäurereihe.

Werden im Rosanilin bezw. Pararosanilin die $NH_2$-Gruppen durch *OH*-Gruppen substituiert, so entsteht die

Rosolsäure



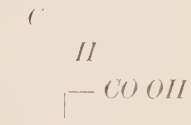
bezw. Pararosolsäure (Aurin).



Diese beiden Farbstoffe bilden in Wasser kaum, in Alkohol leicht lösliche, unschmelzbare Krystalle, Alkalien lösen sie mit roter Farbe. Die Rosolsäure ist einer der gebräuchlichsten Indikatoren, wo es sich um $NH_3$-Empfindlichkeit handelt.

### C) Phthaleïne.

Als hypothetische Muttersubstanz der Phthaleïne kann man sich die Orthocarbonsäure des Triphenylmethan

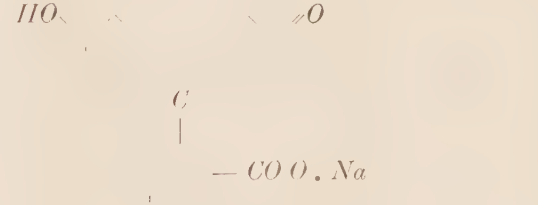


denken.

Der einfachste Farbstoff der Reihe ist das

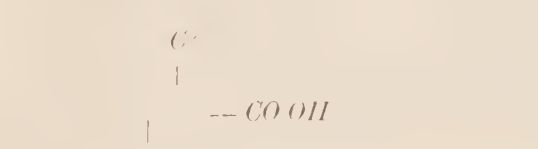
Phenolphthaleïn,

welches, wenigstens in Form seiner Alkalisalze, folgende Carbonsäure ist:

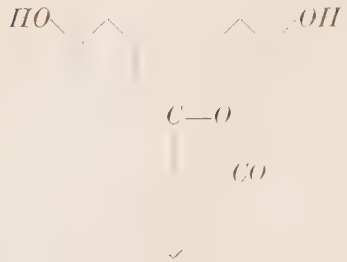


(chinoïde Form des Phenolphthaleïns).

Dieses Salz hat eine rote Farbe und wird durch Säuren entfärbt. Das kommt daher, dass die freie Carbonsäure



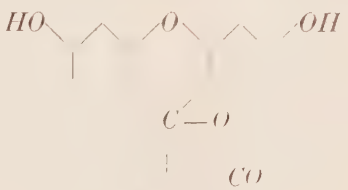
nicht existenzfähig ist und im Augenblick des Entstehens sich umlagert zu Dioxy-Phthalophenon der Constitution:



(lactoïde Form des Phenolphthaleïns).

Dieses hat keine chinonartige Doppelbindung und ist daher farblos. Daraus erklärt sich der Farbenumschlag des Phenolphthaleïns.

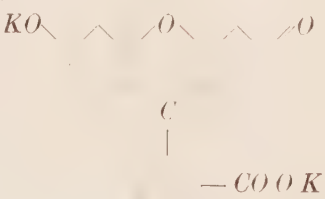
Werden die beiden hydroxylierten Benzolkerne noch durch ein *O*-Atom verbunden, so entsteht



Fluoresceïn,

welches in alkalischer Lösung dieselbe Umwandlung zu einer Carbonsäure erfährt wie das Phenolphthaleïn.

Das Kaliumsalz, Uranin



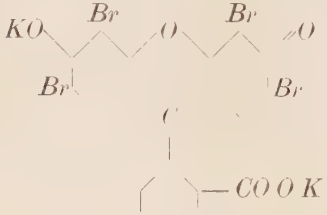
bildet einen gelb-roten Farbstoff, der besonders in verdünnten Lösungen eine unübertroffene gelbgrüne Fluorescenz zeigt. Es giebt kaum einen Körper, dessen Anwesenheit in wässeriger Lösung schon bei so minimalen Quantitäten erkannt werden kann, als das Fluoresceïn infolge der Fluorescenz seiner alkalischen Lösung.

Werden in die Benzolkerne Bromatome eingeführt, so entstehen die

Eosine.

Mit der Zahl der Bromatome nähert sich der Farbenton dem bläulich-roten. Das gewöhnliche Eosin ist

Tetrabromfluoresceïnkalium,



ein roter, sehr intensiver Farbstoff, der, wenn auch weniger als das Fluoresceïn, eine starke gelbe Fluorescenz zeigt. Diese ist in wässeriger Lösung geringer als in Alkohol und besonders in Aceton. Durch Mineralsäuren, unvollständig durch Essigsäure, wird die freie Farbsäure in gelben Flocken ausgefällt. Sie löst sich leicht in Alkohol.

Die Stellung der Bromatome ist nicht sicher bekannt.

In derselben Weise stellt das

Tetrajodfluoresceïnkalium

das

Erythrosin

dar, welches einen etwas bläulicheren Ton als das Eosin hat.

Während die lactoïde Form des Phenolphthaleïn ganz farblos ist, zeigt die lactoïde Form des Fluoresceïn und Eosin eine leichte Gelbfärbung. Die letztere beruht offenbar auf dem Vorhandensein des Ringes:



bei dem das *C*-Atom mit zwei Valenzen nach aussen gebunden ist. Dieser Ring gleicht in der Lage seiner Bindungen einem Parachinon, bei dem die eine $C=O$-Gruppe durch *O* substituiert ist. Beim Phenolphthaleïn ist dieser Ring nicht vorhanden.

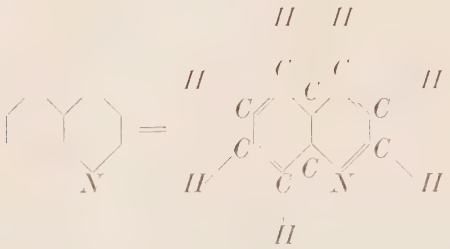
Als Träger der Fluorescenz muss man das bindende *O*-Atom ansehen, welches sich auch bei den fluorescierenden Farbstoffen Rhodamin, Pyronin und allen Oxoninen findet. Das Phenolphthaleïn, dem dieses *O*-Atom mangelt, fluoresciert nicht, während das Fluoran,



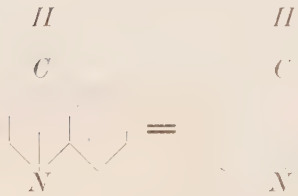
welches zwar dieses *O*-Atom, aber gar keine salzbildende Gruppe enthält, in Schwefelsäure gelöst, schon fluoresciert.

### h) Chinolin- und Acridinfarbstoffe.

Das Chinolin



und Acridin



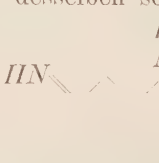
sind die Muttersubstanzen einiger Farbstoffe.

Aus dem an und für sich ungefärbten Chinolin entsteht schon durch den Eintritt einer *OH*-Gruppe in Orthostellung zum *N* ein Beizenfarbstoff. Die meisten Chinolinfarbstoffe haben jedoch nicht das Chinolin selbst als Chromophor, sondern sind höchstwahrscheinlich ähnlich den Triphenylmethanfarbstoffen constituiert. Dahin gehören die Cyanine, stark basische Farbstoffe von blauer Farbe, welche durch überschüssige Säure sehr leicht in farblose zweisäurige Salze übergeführt werden und deshalb nur geringen Wert haben; ferner das Chinolinrot, ein Farbstoff mit eminenter Fluorescenz, und das Chinolingelb. Hierhin kann man auch das

Flavanilin

rechnen, dessen einsäurige Salze gelbe, basische Farbstoffe sind.

Das Acridin ist an sich schon schwach gelb gefärbt, noch stärker aber in Form seiner Derivate, z. B. als Amidoacridin, was auf folgende Constitution desselben schliessen lässt:



An dieser Formel erkennt man sofort den Parachinontypus.

Vom Acridin leiten sich die für die Histologie bedeutungslosen Farbstoffe Acridingelb, Acridinorange ab. Amidoderivate eines an dem in Parastellung zum *N* befindlichen *C*-Atoms phenylierten Acridins sind das Benzolflavin und Chrysanilin. Die Acridinfarbstoffe zeichnen sich durch starke Fluorescenz aus.

Das „Acridinrot“ ist kein Acridinfarbstoff.

### i) Oxychinone und Chinonoxime.

Das Chinon, ein indifferenter Körper, und als solcher nur Chromogen, aber kein Farbstoff, wird durch Eintritt säurebildender Gruppe zum Farbstoff, und zwar kommen vor allem zwei Gruppen in Betracht, die Hydroxylgruppe und die Nitrosogruppe, bezw. die Isonitrosogruppe (*NOH*). Sobald sich diese salzbildende *OH*-Gruppe in Orthostellung zu dem *O* des Chinons befindet, entsteht ein Beizenfarbstoff. Die Isonitrosogruppe tritt in der Weise in das Chinon ein, dass sie das eine *O*-Atom desselben substituiert, z. B.



*NOH*

Chinonoxim,

welches tautomer ist mit Nitrosophenol:

*OH*

*NO*

Wenn oben bei den chromophoren Gruppen die Nitrosogruppe mit aufgezählt wurde, so geschah das in dem Sinne, dass die Nitrosoderivate der Phenole tautomer mit den Oximen der Chinone sind.

Die Chinone, welche als Muttersubstanzen dieser Farbstoffe in Betracht kommen, sind



Chinon, α Naphthochinon, β Naphthochinon und Anthrachinon.

Die Derivate des einfachen Chinons sind für die Färberei ohne wesentliche Bedeutung.

Von den Derivaten des Naphthochinon sei erwähnt das

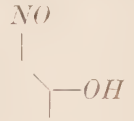
Naphthazarin,

Dioxy α naphthochinon, welches mit Thonerde einen violetten, mit Chromoxyd einen violettschwarzen Lack erzeugt.

Von der Constitution des β Naphtochinons ist das

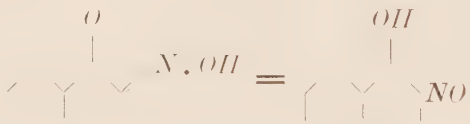
α Oxim des β Naphtochinons,

welches durch Einwirkung von salpetriger Säure auf β Naphthol entsteht und sich demgemäss als tautomer mit dem



α Nitroso β naphtol

erweist; ferner das

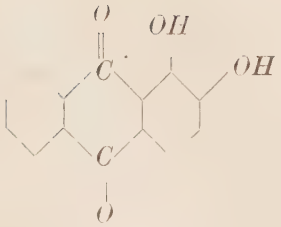


β Oxim des α Naphthochinons, tautomer mit β Nitroso α naphthol.

Bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf α Naphthol entsteht ausser dem eben genannten Körper auch noch

α Nitrosa α naphthol, welches aber kein Beizenfarbstoff ist.

Die wichtigsten Farbstoffe dieser Gruppe sind die Derivate des Anthrachinons. Der einfachste Repräsentant dieser Klasse ist das




Dioxyanthrachinon = Alizarin.

Dieser Farbstoff, welcher in der Industrie die allergrösste Bedeutung hat, findet sich in der Natur in Form eines Glukosids, der Ruberythrinsäure, im Krapp, der Wurzel von Rubia tinctorum. Dieses Glukosid spaltet sich beim Kochen mit Säuren und durch Fermente in Glukose und Alizarin. Heute wird das Alizarin fast nur noch synthetisch hergestellt, z. B. durch Schmelzen eines zweifach bromierten Anthrachinons mit Aetzkali. Im Grossen wird es durch Verschmelzen der Anthrachinonmonosulfosäure mit Aetzkali dargestellt. Bei dieser Prozedur gehen verschiedene chemische Prozesse vor sich, welche schliesslich alle in der Bildung von Alizarin gipfeln.

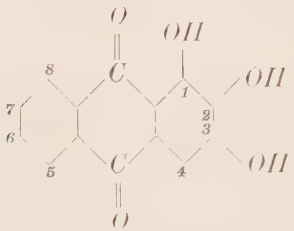
Das Alizarin bildet rotbraune Nadeln oder ein gelbes Pulver, welches in Wasser äusserst schwer, in Eisessig und Glyzerin besser löslich ist. In Natronlauge löst es sich zu seinem tiefpurpurrot gefärbten Natronsalz. Es bildet mit geeigneten Metalloxyden sehr verschieden gefärbte Lacke. Der Aluminiumlack ist rot, der Eisenlack schwarzviolett, der Chromlack violettbraun. Wenn man der Beizung mit Thonerde noch eine Behandlung mit Ölbeizen (rizinusölsaures Ammoniak) folgen lässt, so erhält man scharlachrote Farben (Türkischrot-Prozess). Wahrscheinlich bildet hierbei die Thonerde Doppelverbindungen, einerseits mit der Ölsäure, andererseits mit dem Alizarin. Auch sonst spielt die Anwendung von Doppelbeizungen und anderer, wenig aufgeklärter, empirischer Handgriffe in der Alizarinfärberei eine grosse Rolle.

Die Alizarinmonosulfosäure (Alizarin *S*, Alizarinrot) bildet einen wasserlöslichen Farbstoff, der in Form seines Natriumsalzes besonders als Indikator verwandt wird. Es ist in neutraler Lösung gelbbraun, wird durch überschüssige Säuren citronengelb und durch Alkali purpurviolett gefärbt. Primäre Phosphate wirken wie Säuren, sekundäre wie Alkalien, und dies mit einer solchen Schärfe, wie bei keinem anderen Indikator. Deshalb kann es bei der Titerstellung einer Normalphosphatlösung verwandt werden und erspart die schwierige Reindarstellung und Abwägung des Phosphats. In einer Lösung von sekundärem Natriumphosphat kann man den Gehalt an Phosphorsäure dadurch bestimmen, dass man mit Hilfe des Alizarinrots bestimmt, wieviel ccm $^1/_{10}$ n. Säure man dazu braucht, um das sekundäre in das

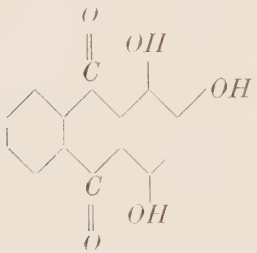
primäre Phosphat zu verwandeln. Der Endpunkt der Reaktion wird durch das Auftreten der reinen citronengelben Farbe gegeben.

### Trioxyanthrachinone

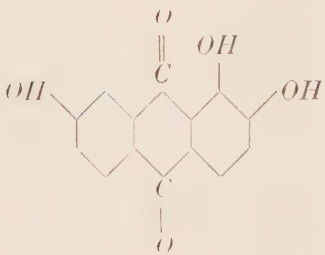
1. Anthragallol, Trioxyanthrachinon 1 : 2 : 3.



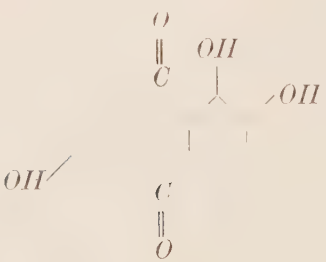
2. Purpurin, Trioxyanthrachinon 1 : 2 : 4.



3. Isopurpurin, Trioxyanthrachinon 1 : 2 : 7.



4. Flavopurpurin, Trioxyanthrachinon 1 : 2 : 6.



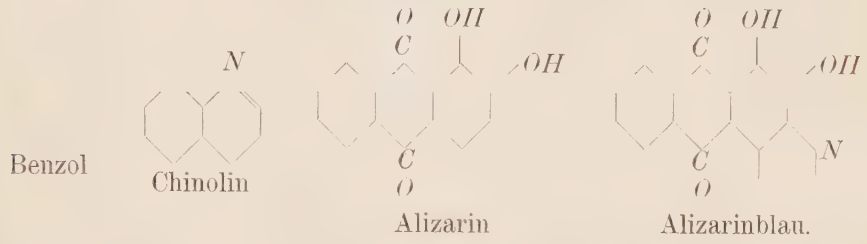
Das Anthragallol ist braun und erzeugt mit Thonerde und Chrom braune Lacke.

Das Purpurin findet sich neben dem Alizarin im Krapp und ist dem käuflichen Alizarin oft beigemengt. Es ist in Wasser besser

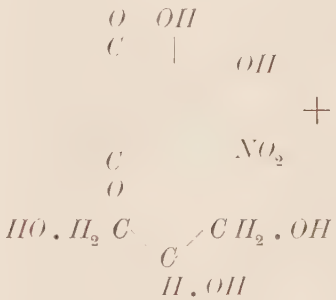
löslich als Alizarin. In Alkalien löst es sich rotviolett, wird aber an Luft und Licht schnell gebleicht. Der Thonerdelack des Purpurins ist gelbstichiger als der des Alizarins.

Von den höher hydroxylierten Anthrachinonen seien noch die Rufigallusäure, Hexaoxyanthrachinon 1 : 2 : 3 : 5 : 6 : 7, erwähnt.

Ein durch die Untersuchungen von Ehrlich auch der Physiologie (bei der vitalen Färbung) bedeutungsvoll gewordener Farbstoff ist das Alizarinblau, welches sich in seiner Constitution zum Alizarin ebenso verhält, wie das Chinolin zum Benzol:




Es entsteht aus 3 Nitroalizarin durch Erhitzen mit Glyzerin und Schwefelsäure:



Glyzerin

Es bildet bräunlich-violette Nadeln, welche in Wasser unlöslich, in Alkohol schwer löslich sind. In Alkalien löst es sich mit blauer, in einem Überschuss von Alkalien mit grüner Farbe.

In derselben Weise entsteht aus (4) Nitroalizarin und Glyzerin das Alizaringrün.

## 4. Einige unwichtigere, nicht nach dem Chinontypus gebaute Farbstoffe.

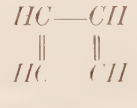
So weit sich auch die Theorie von dem chinonartigen Bau der organischen Farbstoffe durchführen lässt, so bleiben immer doch noch einige Gruppen von Farbstoffen übrig, welche in dieses Schema nicht hineinpassen. Schon bei den Azofarbstoffen hatten wir gesehen, dass einige Farbstoffe, und vor allem das Chromogen der Azofarbstoffe selbst, das Azobenzol, nicht, oder nur unter einer gewissen, etwas

gezwungenen Annahme (s. p. 9) als chinonartig gedacht werden können. Es bleiben jetzt noch einige, übrigens für die Histologie recht unwichtige Klassen von Farbstoffen übrig, welche weder chinonartig gebaut sind, noch mit chinonartigen Körpern tautomer sind.

### a) Die Indigofarbstoffe.

Die Muttersubstanz dieser Farbstoffe ist das Indol, welches

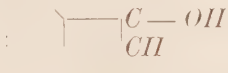
seinerseits als Benzo-Pyrrol



Pyrrol

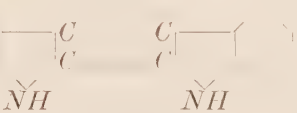
aufgefasst werden kann.

Das nächste, zur Indigogruppe führende Derivat des Indols ist das Indoxyl,



welches mit Schwefelsäure gepaart im tierischen Organismus vorkommt. Durch eine oxydative Condensation zweier Moleküle Indoxyl entsteht

Indigoblau (Indigotin).



Es kommt in Form eines Glukosids, des Indikans,[1]) in verschiedenen Pflanzen (Indigofera tinctoria, Indigofera Anil, Polyponum tinctorium, Isatis tinctoria) vor. Durch Gährung entsteht aus diesem der Indigo, das Rohprodukt des Indigoblaus, welches ausser diesem an Farbstoffen noch Indigorot, -braun und -gelb enthält. Im reinen Zustande bildet das Indigoblau kupferglänzende Krystalle oder ein tiefblaues Pulver. Es ist nicht schmelzbar und sublimiert als purpurroter Dampf. In Wasser und Alkohol ist es völlig unlöslich. In Anilin, Chloroform, Nitrobenzol, Phenol löst es sich mit blauer Farbe, in Paraffin mit purpurroter Farbe.

[1]) Nicht zu verwechseln mit dem tierischen Indican, indoxylschwefelsaurem Natron.

Trotz seiner beiden *NH*-Gruppen zeigt das Indigoblau durchaus keine Neigung, mit Säuren Salze zu bilden. Nur in konzentrierter Schwefelsäure wird es mit grüner Farbe gelöst, geht aber beim Erwärmen in die blaue, wasserlösliche Indigosulfosäure über.

Es ist also ein ebenso indifferenter Körper wie z. B. das Azobenzol und als solcher kein eigentlicher Farbstoff, sondern ein Chromogen. Es ist daher auch nicht möglich, mit einer Lösung von Indigoblau zu färben. Die Färbung mit Indigoblau ist eine Küpenfärbung, also weder eine substantive noch adjektive Färbung. Durch alkalische Reduktionsmittel geht nämlich das Indigoblau in das um zwei *H*-Atome reichere Indigoweiss über:

Dieses hat infolge seiner *OH*-Gruppen phenolartige Eigenschaften und ist daher in Alkalien löslich. Es hat die Fähigkeit, wie andere Phenole, auf der Faser wie ein Farbstoff haften zu bleiben. Das Indigoweiss verküpt an der Luft sehr energisch wieder zu Indigoblau. Die Färbung mit Indigo geschieht also in der Weise, dass man das Gewebe zunächst mit einer alkalischen Lösung von Indigoweiss behandelt. Diese stellt man sich durch Reduktion des unter Zusatz von Kalk oder Soda in Wasser aufgeschwemmten Indigoblaus mittelst Zinkstaub, Traubenzucker, hydroschwefligsauren Natrium oder anderer Reduktionsmittel her. Dann setzt man das Gewebe der Oxydation durch die Luft aus, wobei sich das völlig unlösliche Indigoblau auf der Faser bildet.

Es sind viele künstliche Synthesen des Indigoblau gelungen, welche jedoch rein chemisches Interesse haben.

Die Monosulfosäure des Indigoblau ist in Wasser mit blauer Farbe löslich, in verdünnter Schwefelsäure unlöslich; die Salze sind in reinem Wasser schwerlöslich, in salzhaltigem Wasser unlöslich.

Die Disulfosäure ist in Wasser besser löslich. Ihr Natronsalz ist der unter dem Namen „Indigcarmin" oder auch „Indigosulfosäure" benutzte Farbstoff.

Von Indigo-ähnlichen Farbstoffen sei erwähnt:

Indigpurpurin, isomer dem Indigblau. In Alkohol mit roter Farbe löslich.

Indirubin, ebenfalls dem Indigblau isomer. Ob die beiden letzten Farbstoffe nicht vielleicht identisch sind, ist nicht sicher.

Als Indigrot bezeichnet man einen in dem natürlichen Indigo enthaltenen roten Farbstoff, der wahrscheinlich mit den beiden vorigen identisch ist.

### b) Oxyketonfarbstoffe und verwandte.

1. Oxyketone. Aromatische Ketone werden, wenn sie am Benzolring zwei in Orthostellung befindliche Hydroxylgruppen besitzen, zu Beizenfarbstoffen.

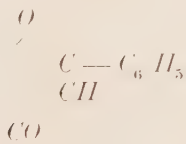
Beispiel: Gallacetophenon (Trioxyacetophenon)

$$CH_3 . CO . C_6 H_2 . (OH)_3$$
$$1 . 2 . 3 .$$

2. Xanthone, Typus:

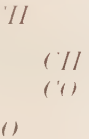
Euxanthon

3. Flavone, Derivate des hypothetischen Flavon:



kommen zahlreich in der Natur vor und sind alle gelb gefärbt.

4. Cumarine, Typus:



## 5. Einige wichtige Farbstoffe unbekannter Constitution.

### a) Haematoxylin.

Das in der Histologie so ausserordentlich vielfältig verwandte Haematoxylin ist im Blauholz oder Campecheholz, dem Kernholz von Haematoxylon campechianum, enthalten.

Das reine Haematoxylin krystallisiert mit 3 $H_2O$ in farblosen tetragonalen Säulen oder mit 1 $H_2O$ rhombisch. Es ist sehr schwer in kaltem, besser in warmem Wasser löslich; in Alkohol, Äther ist es leicht löslich. Es dreht die Ebene des polarisierten Lichtes nach rechts. Es oxydiert sich äusserst leicht zu verschiedenen Oxydationsprodukten, besonders in alkalischer Lösung.

Mit Alkalien bildet es purpurne Salze, welche allerdings sehr schnell zu den blauvioletten Haemateïn-Salzen oxydiert werden.

Durch Oxydationsmittel, wie Salpetersäure, wird das Haematoxylin durch mannigfache Stufen hindurch schliesslich zu Oxalsäure

oxydiert. Das erste Oxydationsprodukt ist genauer bekannt und heisst Haemateïn, $C_{16}\ H_{12}\ O_6$.

Dieses bildet in reinem Zustande dunkelgrüne, metallglänzende, im durchfallenden Lichte rote Massen, welche sich zu einem violetten Pulver zerreiben lassen, oder kleine rote Krystalle. In Wasser, Alkohol und Äther löst es sich mit gelbbrauner Farbe. Alkalien färben es tief blauviolett.

Eine etwas höhere Oxydationsstufe des Haematoxylins, welche aber wegen ihrer Unbeständigkeit nicht isoliert zu erhalten ist, scheint mir der empfindlichste Indikator bei der alkalimetrischen Titration zu sein, der nur denkbar ist. In saurer Lösung ist eine fast unendlich verdünnte Lösung hellcitronengelb, eine alkalische Lösung dunkel graublau. Der Umschlag erfolgt selbst bei Gegenwart von Ammoniak in den grössten Verdünnungen mit einer unerreichbaren Schärfe. Der allgemeinen Anwendung als Indikator steht nur der Umstand im Wege, dass während des Titrierens schon, besonders, wenn die Flüssigkeit alkalisch ist, beim Umschwenken des Kolbens die Oxydation allmählich weiter schreitet und die höheren, wie auch die niederen Oxydationsstufen nicht so scharf umschlagen.

Das Haematoxylin und seine Oxydationsprodukte bilden mit Metallsalzen verschieden gefärbte Lacke. In der Industrie verwendet man es in Form von Blauholz-Decoct oder Extrakt und erzeugt durch Thonerdebeizen grauviolette, mit Kupfersalzen dunkelblaue, mit Eisensalzen und Chromsäure tief schwarze Lacke. Diese Lacke sind aber nicht die Metallsalze des Haematoxylins selbst, sondern seiner verschiedenen, nur ungenügend bekannten Oxydationsprodukte.

Wenn man z. B. Haematoxylin auf mit Chromsäure gebeizte Gewebe einwirken lässt, so oxydiert die Chromsäure das Haematoxylin zu — sagen wir „Haematein“ —, während die Chromsäure selbst zu basischem Chromoxyd bezw. einem Salz desselben reduziert wird. Dieses Chromoxyd bildet erst mit Haematein den Lack. Derselbe Vorgang findet z. B. bei der Weigert'schen Markscheidenfärbung statt.

Ebenso wird Eisenchlorid durch Haematoxylin zu Eisenchlorür reduziert, und dieses erst bildet mit dem entstandenen Haematein den prachtvollen tiefblauschwarzen Lack. Benutzt man zur Färbung „überreiftes“ Haematoxylin, welches gar kein Haematoxylin mehr enthält, so erhält man nicht jenen schönen, blauschwarzen Lack, sondern einen schmutzig-braunen, der offenbar ein Lack des Ferrisalzes mit einer noch höheren Oxydationsstufe des Haematoxylins ist. Dagegen erhält man mit Ferrosalzen (Ferrum sulfuricum) mit überreifem Haematoxylin immer noch den schönen blauschwarzen Lack.

In anderen Fällen wirkt nicht die Beize selbst als Oxydations-

mittel, z. B. bei der Alaunbeizung. Hier tritt die Oxydation im Verlauf der „Reifung“ der Farblösung ein.

### b) Carmin.

Das Ausgangsmaterial für das Carmin ist die Cochenille, welche ein Trockenpräparat der Weibchen von Coccus cacti coccinellifera ist. Das färbende Prinzip dieses Präparats ist die Carminsäure $C_{17}\ H_{16}\ O_{10}$, ein Glukosid, welches durch Fällen des wässerigen Extraktes des Carmins mit Bleiacetat und Entfernen des Bleies durch Schwefelwasserstoff gewonnen wird. Sie bildet eine purpurbraune, beim Zerreiben rot werdende Masse, welche leicht in Wasser und Alkohol, schwerer in Äther löslich ist. Die Carminsäure ist eine schwache, zweibasische Säure, welche mit Alkalien leicht lösliche, mit Schwermetallen unlösliche violette Salze bildet. Als Glukosid lässt sich die Carminsäure durch verdünnte Säuren in einen Zucker $C_6\ H_{10}\ O_5$ und in Carminrot $C_{11}\ H_{12}\ O_7$, spalten. Dieses bildet eine dunkelrote, grünschillernde Masse, welche in Wasser und Alkohol, aber nicht in Äther löslich ist. Auch das Carminrot ist eine schwache, zweibasische Säure und bildet Salze, die der der Carminsäure ähnlich sind.

Die Angaben über den soeben beschriebenen Zusammenhang zwischen Carminsäure und Carminrot sind jedoch noch umstritten.

Das „Carmin“ des Handels ist ein aus Cochenille dargestelltes Präparat, welches rote, poröse Massen bildet, die sich leicht zu einem roten Pulver zerreiben lassen. Er ist, wenn nicht verunreinigt, in Ammoniakhaltigem Wasser rückstandslos löslich, jedoch in reinem Wasser unlöslich. Er wird angeblich durch Versetzen des wässerigen Cochenilleauszuges mit Alaun hergestellt. Der Carmin enthält nach Liebermann 3 % Thonerde und 3 % Kalk, ferner 20 % eiweissartige Stoffe. Es ist wahrscheinlich, dass alle diese drei Beimengungen zu der Bildung eines eigenartigen Lackes beitragen.

Die Cochenille ist ein ausgesprochener Beizenfarbstoff. Ohne Beize fixiert er sich nicht auf der Faser. Er ist ferner ein stark polygenetischer Beizenfarbstoff. Der Zinnoxydlack der Carminsäure (oder des Carminrots?) hat die bekannte scharlachrote Nuance. Der Thonerdelack ist violett, der Eisenlack schwärzlich grau.

Mayer machte die reine Carminsäure zum Ausgangspunkt seiner histologisch-technischen Untersuchungsmethoden. Ihr Ammoniaksalz färbt so gut wie gar nicht, die Carminsäure ist also ein echter Beizenfarbstoff. Den Thonerdelack erhält man durch Fällen einer Lösung von Carminsäure oder ihres Ammoniaksalzes mit Aluminiumacetat. Es ist in einem Überschuss des Aluminiumacetat, sowie in Säuren, sauren Salzen, andererseits auch in Alkalien, wie Borax, löslich. Auf diese Weise kann man sich leicht eine „Tinte“ (vgl. Capitel

Beizenfärbung) herstellen. Fügt man zu Carminsäure nicht Aluminiumacetat, sondern Alaun hinzu, so fällt der Lack gar nicht aus, sondern bleibt gleich in Lösung. Diese Lösung ist der Carmalaun von Mayer. Er färbt violett.

Wenn man einen Doppellack mit Kalk und Thonerde bildet, so entsteht der carmoisinrote Farbstoff. Er bildet den Paracarmin von Mayer.

Der Alauncarmin ist eine Lösung von Carmin in Alaunlösung. Der Boraxcarmin ist eine wässrig-alkoholische Lösung des käuflichen „Carmins“ in Borax.

Das Pikrocarmin, welches seinerzeit von Ranvier angegeben wurde, ist ein Gemisch von pikrinsaurem Ammoniak mit Ammoniakcarmin. Es ist ein äusserst unbeständiges, launenhaftes Färbemittel, das gegen irgend welche anderen Doppelfärbungen, z. B. Haematoxylin-Eosin, nur Nachteile hat.

## III. Theorie des Färbeprozesses.

Man unterscheidet substantive und adjektive Färbungen. Von einer substantiven Färbung spricht man, wenn der Farbstoff sich aus seiner Lösung direkt auf das zu färbende Gewebe niederschlägt, von einer adjektiven Färbung, wenn er dies erst nach vorausgegangener Durchtränkung des Gewebes mit einem anderen Stoff, der sog. Beize, unter deren Vermittelung, thut.

Ausserdem giebt es noch Küpenfärbungen und Entwickelungsfärbungen, welche in der Histologie eine geringere Bedeutung haben und weiter unten besprochen werden.

### 1. Die substantive Färbung.

Die Frage nach dem Wesen des substantiven Färbeprozesses ist zu verschiedenen Zeiten und von verschiedenen Autoren verschieden beantwortet worden. Die einen hielten die Färbung für einen physikalischen, die anderen für einen chemischen Vorgang. Um nun nicht mit wesenlosen Worten zu operieren, wollen wir zunächst definieren, was wir hier unter einem chemischen und einem physikalischen Prozess verstehen wollen, denn nicht in allen Fällen sind diese beiden Begriffe so scharf von einander geschieden, dass ein Durcheinanderwerfen nicht möglich wäre.

Die Anhänger der chemischen Theorie des Färbeprozesses fassen die Färbung als eine Salzbildung zwischen dem Farbstoff und der Faser auf. Wenn man z. B. Pikrinsäure und Seide zusammenbringt, so spielt die Seide die Rolle einer Base und es bildet sich das pikrinsaure Salz derselben. Demgemäss wollen wir daran festhalten, dass wir eine Färbung nur dann als chemisch bezeichnen, wenn eine solche Salzbildung zwischen dem Farbstoff und dem Gewebe zu stande kommt. Eine solche chemische Färbung darf, unter Zugrundelegung aller chemischen Erfahrungen, nicht durch ein blosses Lösungsmittel für den Farbstoff gespalten werden können. Eine chemische Färbung ist nicht durch Alkohol allein extrahierbar; dagegen kann sie sehr wohl auf chemischem Wege, z. B. durch Säuren, vernichtet werden.[1])

[1]) Über scheinbare Ausnahmen von diesem Gesetze vgl. S. 81.

Jede Färbung, welche ohne eine solche Salzbildung zu stande kommt, bezeichne ich im Folgenden als eine physikalische. Der Begriff des Physikalischen ist dabei vielleicht etwas weit gefasst, da die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen ist, dass bei manchen Färbungen, die nicht auf einer Salzbildung beruhen, doch vielleicht auch lockere additionelle Bindungen durch chemische Kräfte stattfinden mögen. Aber jedenfalls handelt es sich selbst dann nicht um eine Salzbildung, überhaupt nicht um eine Bindung, welche durch die salzbildende Gruppe des Farbstoffs vermittelt wird, sondern um eine lockere Bindung, welche schon durch ein Extraktionsmittel für einen ihrer Komponenten gesprengt werden kann.

Um nun zu der Frage nach dem Wesen der Färbung Stellung zu nehmen, muss ich zunächst betonen, dass es einerseits bei einer Reihe von Färbungen unwiderlegliche Beweise für ihre chemische Natur, bei anderen wieder für ihre physikalische Natur giebt. Zunächst führe ich einige Thatsachen an, welche für die physikalische Natur der Färbung sprechen.

1. Es lassen sich Stoffe färben, welche überhaupt nicht die Fähigkeit zu einer Salzbildung haben, z. B. die Cellulose in Form von Baumwolle oder Papier. Freilich ist die Cellulose im stande, mit starken Säuren unter bestimmten Bedingungen Ester, also immerhin salzartige Verbindungen zu bilden (Cellulosenitrat), aber dies ist eine tiefgreifende chemische Veränderung, welche niemand mit der Färbung vergleichen wird. Auch der eifrigste Verfechter der chemischen Theorie wird nicht behaupten können, dass die Cellulose bei der Färbung mit einem sauren Farbstoff esterifiziert würde. Denn selbst die Salpetersäure bildet nur im freien Zustand mit der Cellulose einen Ester, nicht aber, wenn man sie in Form eines Salzes auf die Cellulose einwirken lässt. Dagegen lässt sich die Baumwolle mit Leichtigkeit mit Congorot, dem Natriumsalz einer Amidosulfosäure, intensiv färben.

Sogar anorganische Körper indifferenter Natur nehmen Farbstoffe auf. So lässt sich z. B. Schwefelmilch, gallertartige Kieselsäure, Kieselguhr mit basischen Farbstoffen färben.

2. Es giebt Stoffe, welche sich mit den neutralen Farbstoffen färben, ohne sie zu zerlegen. Da die neutralen Farbstoffe Salze aus einer Farbbase und einer Farbsäure sind, so müsste, wenn jede Färbung ein chemischer Prozess wäre, ein Gewebsbestandteil sich entweder mit der Farbe der Farbbase oder der Farbsäure anfärben. Wenn er aber den neutralen Farbstoff als Ganzes aufnehmen kann, so kann er dies nicht durch eine Salzbildung thun.

Nun kann allerdings folgender Einwand gemacht werden. Die meisten Farbstoffe besitzen nicht nur eine, sondern mehrere salz-

bildende Gruppen. So enthält z. B. das Methylgrün und das Methylenblau 3 Amidogruppen, und das Säurefuchsin (Rosanilindisulfosaures Natron) 2 Sulfosäuregruppen. Wenn daher ein Gewebsbestandteil sich mit dem neutralen Farbstoff: rosanilinsulfosaure Methylgrünbase färbt, so wäre es noch möglich, dass eine von den noch freien salzbildenden Gruppen die Salzbildung mit dem Gewebe eingeht. Demgegenüber ist aber zu betonen, dass, sobald einmal eine Amidogruppe eines basischen Farbstoffes durch Salzbildung abgesättigt ist, die zweite oder dritte Amidogruppe schwächeren Säuren gegenüber überhaupt keine Neigung zur Salzbildung zeigt. Nur die stärksten Mineralsäuren sind im stande, wenn sie in einem sehr grossen Überschuss vorhanden sind, diese zweite Amidogruppe abzusättigen, und zwar stets unter Veränderung der Farbe. Diese zwei- und dreisäurigen Salze der Farbbasen sind aber so unbeständig, ihre Existenz knüpft sich so sehr an das Vorhandensein einer starken Mineralsäure, dass sie bei der blossen Verdünnung mit Wasser, also bei der Verminderung der Concentration der Mineralsäure in das einsäurige Salz und die freie Säure zerlegt werden. Nur wenn man die zweite Amidogruppe in eine Ammoniumbase verwandelt, ist diese befähigt, beständige zweisäurige Salze zu bilden. Das trifft z. B. gerade für das Methylgrün zu, nicht aber für das Methylenblau, welches mit Säurefuchsin einen neutralen Farbstoff von derselben Wirkung wie das Methylgrün bildet.

Damit ist bewiesen, dass bei der Färbung mit dem neutralen Farbstoff rosanilindisulfosaures Methylenblau zwischen dem Gewebe und der Methylenblaubase keine Salzbildung stattfinden kann. Ebenso lässt sich beweisen, dass zwischen der Rosanilindisulfosäure und dem Gewebe keine Salzbildung stattfindet. Hier ist in der That die zweite Sulfosäuregruppe befähigt, selbst wenn die erste schon abgesättigt ist, auch mit schwächeren Basen zweibasische Salze zu bilden. Diese aber sind farblos. Wenn daher das rosanilindisulfosaure Methylenblau vermöge seiner sauren Komponente eine Salzbildung mit dem Gewebe eingegangen wäre, so wäre die rote Farbe vernichtet; es könnte kein Mischton entstehen, sondern die neutrophilen Gebilde müssten sich mit rosanilindisulfosaurem Methylenblau rein blau färben.

3. Viele Granula färben sich vital mit Neutralrot. Dieser Farbstoff zeichnet sich dadurch aus, dass er je nach der Alkalinität oder Acidität seines Lösungsmittels seine Farbe stark wechselt. In alkalischer Lösung ist er gelbrot, in saurer fuchsinrot. Das liegt daran, dass seine freie Base eine gelbe Farbe, seine einsäurigen Salze eine fuchsinrote Farbe haben. Nun giebt es einige Granula, welche sich mit Neutralrot fuchsinrot, andere, die Mehrzahl, welche sich gelb-

rot färben. Die letzteren verraten dadurch eine alkalische Reaktion und zeigen gleichzeitig, dass das Neutralrot in ihnen zum Teil in Form seiner freien Base enthalten ist. Es hat also keine Salzbildung zwischen der Substanz der Körnchen und der Neutralrotbase stattgefunden.

4. Viele Färbungen lassen sich dadurch vernichten, dass man die gefärbten Gewebe mit einer Flüssigkeit behandelt, welche den Farbstoff leicht löst. So sind z. B. eine sehr grosse Zahl von Farbstoffen in Alkohol leichter löslich als in Wasser. Dementsprechend gelingt es auch, viele Färbungen, welche in wässeriger Lösung zu stande gekommen sind, durch Alkohol zu extrahieren. Andere Färbungen werden zwar nicht durch Alkohol, wohl aber durch Glycerin entfärbt, noch andere durch das noch stärkere Anilin, welches zwar nicht immer als indifferentes Lösungsmittel, sondern häufig als Base reagiert; aber z. B. dem Fuchsin oder Thionin gegenüber verhält es sich als blosses Lösungsmittel.

Nun kann man einwenden, dass es wohlcharakterisierte chemische Verbindungen giebt, welche durch ein blosses Extraktionsmittel für eine ihrer Komponenten gespalten werden können. Das muss unbedingt zugegeben werden. Das beste Beispiel dafür ist die Thatsache, dass die violette Verbindung von Eisenoxydsalzen mit Phenol (oder Salicylsäure) dadurch gespalten werden kann, dass man sie in der wässerigen Lösung mit Äther schüttelt. Dabei bleibt das Eisensalz im Wasser, während das Phenol in den Äther diffundiert. Die violette Färbung geht dabei vollständig verloren, bei concentrierterer Lösung erst nach mehrmaliger Ausätherung. Ferner lässt sich z. B. aus der roten Lösung des salzsauren Dimethylamidoazobenzol die freie Farbbase mit gelber Farbe durch Chloroform ausschütteln. Wie anders aber steht es mit der Extraktion von Farbstoffen! Folgendes Beispiel wird das erläutern.

Rosanilin ist eine farblose Base, deren Salze rot gefärbt sind und unter dem Namen Fuchsin bekannt sind. Wenn man nun eine mit Fuchsin gefärbte, dann durch Auswaschen in Wasser gründlich von allem mechanisch anhaftenden Fuchsin befreite Seidenfaser in Alkohol legt, so wird ein grosser Teil des Farbstoffes aus der Faser extrahiert und diffundiert in roten Farbwolken in den Alkohol hinein. Bestände nun die Färbung der Seidenfaser mit Fuchsin darin, dass die Seide die Rolle einer Säure spielte, welche sich mit der Rosanilinbase zu einer roten, salzartigen Verbindung gepaart hätte, so könnte der Alkohol, wenn überhaupt, doch nur die Wirkung ausüben, dass er dieses Salz zerlegte und die freie Rosanilinbase extrahierte. Diese ist aber farblos, und was der Alkohol extrahiert, sind rote Farbwolken; er extrahiert also ein Salz der Rosanilinbase, nicht die Base

selber. Ganz anders bei der Extraktion der Eisenphenolverbindung durch Äther. Bei dieser Extraktion ging die violette Farbe verloren: und beim roten salzsauren Dimethylamidoazobenzol wurde die gelbe freie Base extrahiert.

5. Als ein geradezu klassisches Beispiel für eine Färbung, welche auf rein physikalischen Prozessen beruht, führe ich die Färbung des Fettes mit den Fettfarbstoffen an. Wie wir weiter unten sehen werden, giebt es Farbstoffe von einer chemisch ganz präzis zu definierenden Constitution, welche die Eigenschaft haben, die Fetttropfen zu färben, z. B. Sudan III und Scharlach R. Diese Farbstoffe haben überhaupt keine salzbildende Gruppe; das ist ihr Charakteristikum, es sind diejenigen Farbstoffe, welche ich oben als die indifferenten bezeichnet habe. Aus einer 30 % alkoholischen Lösung lassen sich diese Farbstoffe ebenso durch Olivenöl, Chloroform, geschmolzenes oder flüssiges Paraffin ausschütteln, wie sich im Schälchen die Fetttropfen in den Zellen mit den Farbstoffen färben. Von irgend einem chemischen Prozess, welcher zwischen dem Farbstoff und dem Fett dabei vor sich ginge, kann natürlich nicht die Rede sein.

Wenn wir somit für eine grosse Zahl von Färbungen gezeigt haben, dass sie nicht chemischer, sondern physikalischer Natur sind, so liegt jetzt die Frage vor, was dies für ein physikalischer Prozess sei und ob es andere physikalische Vorgänge giebt, welche ihm analog sind. Man könnte sie zunächst als eine molekulare Attraktion zwischen den Farbstoff-Molekülen und den Molekülen des Gewebes auffassen. Das ist aber keine eigentliche Erklärung, sondern nur eine Umschreibung. Unna, der sich um die Theorie der Färbungen in vieler Hinsicht die grössten Verdienste erworben hat, fasst die Färbung als eine Art Doppelsalzbildung zwischen dem Farbstoff und dem Gewebe auf. Ehrlich stand auf einem ähnlichen Standpunkt. Aber schliesslich ist diese Auffassung nichts weiter als eine Negation der eigentlichen chemischen Theorie von der Salzbildung zwischen Gewebe und Farbstoff und drückt nur aus, dass der Farbstoff als Ganzes, nicht nach stattgehabter Zerlegung vom Gewebe festgehalten wird. Es ist deshalb eine sehr glückliche Idee von O. N. Witt gewesen, die Färbung als „starre Lösung“ zu bezeichnen, das soll bedeuten, dass sich der Farbstoff in dem Gewebe in derselben Weise befinde wie ein gelöster Körper in seinem Lösungsmittel.

Zunächst mag der Ausdruck der starren Lösung etwas befremdend klingen, da zum Begriff der Lösung sonst die Überführung in den flüssigen Aggregatzustand gehört. Was aber hauptsächlich das Wesen der Lösung ausmacht, dass zwischen den Molekülen des gelösten Körpers und in den intermolekularen Räumen des Lösungsmittels eine gewisse räumliche Harmonie besteht, so dass die Moleküle des gelösten Körpers

in diese Räume gut hineinpassen, das trifft auch vortrefflich für die starre Lösung zu, in welcher sich die Farbstoffe auf der Faser befinden. In der That, die Faser oder das tierische Gewebe, der Zellkern, das Protoplasma sind zunächst Lösungsmittel für den Farbstoff. Die erste Hauptbedingung zum Zustandekommen einer Färbung ist, dass die oben genannte räumliche Harmonie besteht, dass das Molekül des Farbstoffes so gebaut ist, dass es in die intermolekularen Räume des Gewebes hineinpasst. Dass diese Räume bei tierischen und pflanzlichen Geweben wirklich intermolekular, d. h. zwischen den Molekülen im chemischen Sinne gelegen sind, ist weniger wahrscheinlich, als dass sie vielmehr intermicellar, d. h. zwischen den Micellen, das sind grössere Gruppen von Molekülen, gelegen sind. Dafür spricht die Thatsache, dass es hauptsächlich die organisierte Materie ist, welche die Farbstoffe in sich aufnimmt.

Die starre Lösung hat übrigens auch in der anorganischen Natur ihre Analogien. Es giebt gefärbtes Glas, welches den Farbstoff in starrer Lösung enthält, nur dass diese auf andere Weise zu stande gekommen ist. Das Glas hat das färbende Prinzip im geschmolzenen Zustande aufgenommen und beim Erstarren nicht wieder abgegeben. Schliesslich ist auch der Kohlenstoff in den verschiedenen Eisensorten in einer ähnlichen Form enthalten. Dass auch der Schwefel gewisse Farbstoffe in derselben Weise wie die organisierten Gewebe aufnehmen kann, wurde schon erwähnt. Es ist auch keine ausschliessliche Besonderheit gerade der Farbstoffe, zwischen die Micellen des Gewebes einzudringend und hier festgehalten zu werden, sondern auch andere Körper thun das. Wenn man z. B. eine Seidenfaser in eine Naphthollösung legt, dann mit Wasser gut auswäscht, so lässt sich das Naphthol in der Seidenfaser nachweisen. Auch viele Metallsalze werden in dieser Weise vom Gewebe aufgenommen. Wenn man ein Gewebe mit einem Eisenoxydsalz durchtränkt und dann mit Wasser auswäscht, so nimmt es in Gerbsäure eine schwarze Farbe an. Das Eisenoxydsalz ist also in der Faser zurückgeblieben und zwar nicht in der Weise, dass sich eine chemische Verbindung zwischen dem Eisenoxyd und einem sauren Bestandteil des Gewebes gebildet hätte, sondern das Eisensalz ist als Ganzes aufgenommen worden, denn sonst könnte es nicht gegen die Gerbsäure reagieren. Man könnte zwar annehmen, dass die Gerbsäure als stärkere Säure die Gewebssäure in Freiheit und das Eisenoxyd an sich gerissen hätte. Das ist aber nicht der Fall. Denn viel stärkere Säuren als die Gerbsäure, wie verdünnte Salzsäure, sind nicht im stande, das Eisen aus dem Gewebe wieder zu entfernen.

Witt hat auch noch auf eine andere Reihe von Thatsachen aufmerksam gemacht, welche für die starre Lösung ins Gewicht fallen. Fuchsin ist im festen Zustand ein metallisch glänzender Körper von

grüner Farbe. Wenn das Fuchsin in gewöhnlichem festen Aggregatszustand in der Faser enthalten wäre, so müsste bei genügender Concentration die Faser auch diese Farbe zeigen. Eine mit Fuchsin gefärbte Seidenfaser ist aber stets rot, wie eine Lösung von Fuchsin. Die beiden roten Farbstoffe Eosin und Rhodamin fluorescieren in Lösungen mit hellgrüner Farbe, im festen Zustande zeigen sie keine Spur von Fluorescenz. Eine mit Rhodamin oder Eosin gefärbte Seidenfaser fluoresciert in derselben Weise wie eine Lösung dieser Farbstoffe.

Man hat nun auf eine Reihe von Thatsachen aufmerksam gemacht, welche für sich angeblich mit der Theorie von der starren Lösung nicht vereinbaren lassen. Zunächst kann man fragen, weshalb denn nur solche Körper Farbstoffe sind, welche eine salzbildende Gruppe enthalten. Wozu ist die salzbildende Gruppe, wenn bei der Färbung doch keine Salzbildung einzutreten braucht? Das ist aber mit den anderen Thatsachen gut in Einklang zu bringen. Damit das Farbstoffmolekül die oben geforderte räumliche Harmonie mit den intermicellaren Räumen habe, muss es einen bestimmten Bau besitzen. Die der salzbildenden Gruppen beraubten Farbstoffe, also die Chromogene, wie Azobenzol, Chinon, Anthrachinon, Indigoblau sind ebenso wenig in Wasser wie in der Faser löslich. Dagegen sind deren Sulfosäuren oder Hydroxylderivate besonders in Form ihrer Salze sowohl in Wasser, wie in der Faser löslich. Wenn es sich um die Färbung eines Gewebsbestandteiles handelt, welcher mit Wasser durchtränkbar ist, so hat er, ebenso wie das Wasser, für die Chromogene kein Lösungsvermögen. Gewebebestandteile, welche nicht mit Wasser durchtränkbar sind, wie das Fett, nehmen andererseits gerade die mit salzbildenden Gruppen behafteten Farbstoffmoleküle nicht auf, sondern färben sich mit den indifferenten Farbstoffen, welche nach den sonst üblichen Definitionen gar keine richtigen Farbstoffe, sondern nur gefärbte Körper sind. Und warum sich einige Gewebsbestandteile mit sauren, andere mit basischen Farbstoffen physikalisch färben, ist nicht verwunderlicher, als dass sich z. B. der Schwefel nur mit basischen Farbstoffen färbt.

Die Hauptbedingung zum Zustandekommen einer Färbung ist also das Bestehen einer räumlichen Harmonie zwischen den Molekülen des Farbstoffes und in den intermicellaren Räumen des Gewebes oder mit anderen Worten die Löslichkeit des Farbstoffes in dem zu färbenden Substrat. In derselben Weise, wie aus einer wässerigen Lösung wie Resorcin oder Milchsäure diese Stoffe durch Äther ausgeschüttelt werden könnten, so wird auch aus der wässerigen Fuchsinlösung das Fuchsin durch die Seidenfaser oder den Zellkern „ausgeschüttelt“. Viel schlechter wird das Fuchsin aus alkoholischer Lösung aufgenommen, weil es zum Alkohol selbst eine sehr grosse Lösungs-

affinität besitzt. Denn man kann aus einer mit Fuchsin gefärbten Seidenfaser das Fuchsin wiederum mit Alkohol „ausschütteln".

Wir lernen hier einen zweiten Hauptfaktor zum Zustandekommen der Färbung kennen. Der Farbstoff muss nicht nur in dem Gewebe löslich sein, sondern er muss auch zu dem Gewebe eine grössere Lösungsaffinität als zu der Flüssigkeit, in welcher er gelöst ist, besitzen. Eine Färbung wird um so schneller, bezw. um so intensiver erfolgen, je grösser die Differenz zwischen der Lösungsaffinität des Farbstoffes zu dem Gewebe und zu seinem Lösungsmittel ist, oder mit anderen Worten, je grösser der osmotische Druck des Farbstoffs in dem Lösungsmittel gegenüber dem Gewebe ist. Man kann also die Färbekraft eines Farbstoffes erhöhen, wenn man ein Lösungsmittel wählt, zu dem er eine möglichst geringe Lösungsaffinität besitzt. Andrerseits wird natürlich die Färbung um so intensiver und schneller vor sich gehen, je konzentrierter die Farblösung ist. Diese beiden Forderungen stehen in Konflikt mit einander. Der Farbstoff soll in seinem Lösungsstoff möglichst konzentriert gelöst sein und doch eine möglichst geringe Lösungsaffinität zu ihm besitzen. Beide Anforderungen erfüllen nach Möglichkeit diejenigen Farblösungen, welche unter Zusatz von Anilin, Carbolsäure u. s. w. hergestellt sind. Sie sind recht konzentrierte Farblösungen und doch haben die Farbstoffe eine geringe Neigung, in dieser Lösung zu bleiben: Das zeigt das leichte Entstehen von Farbniederschlägen in diesen Lösungen an. Der Farbstoff befindet sich hier gewissermassen in einer übersättigen Lösung. Unna bezeichnet diesen Zustand als Schwebefällung.

Es giebt noch eine Thatsache, welche auf dem ersten Blick in Widerspruch zu stehen scheint mit einer physikalischen Auffassung des Färbeprozesses. Gewisse Farbstoffe haben die Eigentümlichkeit, dass sie manche Gewebselemente mit einer anderen Farbe anfärben, als sie ihre wässerige Lösung zeigt und als sie die Mehrzahl der Gewebselemente färbt; z. B. färbt Methylviolett die Kerne violett, die amyloide Substanz rot. Aber in Wirklichkeit ist dies kein Beweis gegen die physikalische Natur der Färbung. Es giebt auch anorganische Körper, welche in verschiedenen Lösungsmitteln eine verschiedene Farbe zeigen. Jod ist in Alkohol gelöst braun, in Chloroform gelöst violett. Nicht nur die Gewebe haben die Eigentümlichkeit, gewisse Farbstoffe mit verschiedener Nuance in sich aufzunehmen, sondern auch unorganisierte Lösungsmittel.

Wenn nun aber auch zum Zustandekommen einer Färbung diese räumliche Harmonie zwischen den Farbstoffmolekülen und den intermicellaren Räumen ein unbedingtes Erfordernis ist, so soll damit nicht geleugnet werden, dass, nachdem einmal der Farbstoff in das Gewebe hineindiffundiert ist, nun nicht auch eine chemische Reaktion, eine

wirkliche Salzbildung mit gewissen Bestandteilen des Gewebes eintreten kann. Dafür giebt es einige schlagende Beweise.

Rosanilin ist eine ungefärbte Base, ihre sämtlichen Salze sind rot gefärbt. Das *HCl* Salz bildet das Fuchsin. Wenn man nun eine Seidenfaser in eine heisse wässerige Lösung des farblosen Rosanilin bringt, so färbt sie sich rot. Das kann gar nicht anders gedeutet werden, als dass die Faser hier vermöge der in ihr enthaltenen *CO OH* oder ähnlichen Gruppen die Rolle einer Säure übernommen und mit der Rosanilin-Base ein rotgefärbtes Salz gebildet hat. Zunächst scheint es, als ob durch dieses Experiment unwiderleglich bewiesen sei, dass auch die Färbung der Seide mit Fuchsin ein chemischer Prozess ist. Aber das ist doch nicht der Fall. Eine mit Fuchsin gefärbte Faser verhält sich nämlich ganz anders als eine mit Rosanilin gefärbte Faser. Färbt man eine Faser mit Fuchsin und wäscht sie aufs Gründlichste mit Wasser aus, so giebt sie, sobald man sie in Alkohol bringt, einen Teil des Farbstoffes in kurzer Zeit wieder ab. Ist die extrahierende Kraft des Alkohol erschöpft, so lässt sich mit einer Mischung von Alkohol und Anilin ein weiterer Teil des Farbstoffes extrahieren. Dagegen lässt sich einer mit der Rosanilinbase gefärbten Seidenfaser der Farbstoff durch kein physikalisches Extraktionsmittel wieder entziehen. Weder in Alkohol noch in Anilin giebt eine solche Faser eine Spur von ihrem Farbstoff ab. Es ist eben etwas ganz anderes, ob man mit Fuchsin oder Rosanilin färbt. Damit soll aber nicht gesagt sein, dass gar keine Salzbildung bei der Färbung der Seidenfaser mit Fuchsin vor sich gehen könne. Eine intensiv mit Fuchsin gefärbte Seidenfaser giebt nämlich in Alkohol und Anilin nicht ihren gesamten Farbstoff wieder ab, sondern ein Teil widersteht jeder Extraktion. Dieser Rest ist offenbar chemisch an die Faser gebunden. Und wenn man die Seide längere Zeit mit Fuchsinlösung auskocht, so findet man in der That in dem rückständigen Wasser soviel freie Salzsäure, als dem durch die Färbung verbrauchten Fuchsin entspricht.

Ferner hat man, um zu beweisen, dass die Färbung der Seidenfaser mit einigen sauren Farbstoffen eine Salzbildung sei, versucht, in der Seidenfaser eine basische Gruppe nachzuweisen. Es ist gelungen, die Anwesenheit von $NH_2$ Gruppen in der Seidenfaser zu beweisen, indem man sie mit salpetriger Säure diazotiert und durch Behandlung dieser Faser mit der alkalischen Lösung eines Phenols eine Färbung erhielt. Aber mit dem Nachweis einer der $NH_2$ Gruppe ist noch nicht bewiesen, dass bei jeder Färbung mit einem sauren Farbstoff diese auch in Wirksamkeit treten kann und auch immer im stande ist, das Alkalisalz einer Farbsäure zu spalten. Ich will dies durch ein Beispiel erläutern.

Eosin ist in Anilin löslich. Angenommen nun, man kenne die Constitution des Anilin nicht, und es sei in derselben Weise wie bei der Seidenfaser der Nachweis einer Amidogruppe in demselben gelungen. Wäre man deshalb berechtigt, anzunehmen, dass die Lösung des Eosin in Anilin auf einer Salzbildung der Eosinsäure und dem basischen Anilin beruhe? Dann müsste man aber auch annehmen, da das basische Methylenblau in Anilin ebenfalls löslich ist, dass zwischen der Methylenblaubase und dem Anilin als Säure eine Salzbildung stattgefunden hätte, was natürlich widersinnig wäre. Gleichwohl ist die Lösungsfähigkeit des Methylenblau in Anilin so bedeutend, dass man aus einer dünnen wässerigen Methylenblaulösung das Methylenblau durch Anilin vollständig extrahieren kann.

Diese Betrachtung kann man folgendermassen zusammenfassen:

1. Jede Färbung ist zunächst ein physikalischer Prozess, welcher sich als starre Lösung des Farbstoffes in dem zu lösenden Subtrat bezeichnen lässt. Deshalb ist die Grundbedingung zum Zustandekommen einer Färbung die räumliche Harmonie zwischen den Molekülen des Farbstoffes und den intermicellaren Räumen des Gewebes.

2. Ist einmal der Farbstoff in diese Räume hineindiffundiert, so kann eine chemische Bindung zwischen dem Farbstoff und dem Gewebe eintreten.

Wir werden demnach zwischen einer physikalischen und chemischen Färbung zu unterscheiden haben. Noch besser aber werden wir daran thun, die nicht scharf gegen einander zu differenzierenden Begriffe des „Chemischen“ und „Physikalischen“ ganz fallen zu lassen — denn es könnte jemand sagen, er wolle auch den blossen Lösungsvorgang als einen chemischen Prozess bezeichnen, ohne dass man dem widersprechen könnte — und durch andere zu ersetzen.

Und so will ich im folgenden diejenige Färbung, bei der das Farbsalz sich als Ganzes, in „starrer Lösung“ auf der Faser befindet, als **Insorption,** die Färbung unter Salzbildung zwischen Farbstoff und Gewebe als Färbung durch **Injunktion** bezeichnen.

Das Kriterium für die insorptive Färbung ist, dass die Färbung sich durch eine nur lösend wirkende, chemisch indifferente Flüssigkeit extrahieren lässt.

Das Kriterium der injunktiven Färbung ist, dass der Farbstoff sich nur durch chemisch wirkende Mittel, welche im stande sind, Salze zu zerlegen, — z. B. freie Säure — extrahieren lässt.

Ferner ist aber auch der Fall denkbar, dass eine insorptive Färbung nicht durch indifferente Flüssigkeiten zu extrahieren ist, weil die Lösungsaffinität des Farbstoffes zu dem Gewebe grösser sein könnte, als zu irgend einem Extraktionsmittel.

Die Enscheidung, ob eine Färbung insorptiv oder injunktiv sei, muss man in jedem einzelnen Falle zu fällen suchen. Nicht immer wird die Entscheidung möglich sein. Nur soviel ist stets sicher:

Wenn es gelingt, eine Färbung durch ein indifferentes Lösungsmittel zu extrahieren, so handelt es sich immer um eine insorptive Färbung.

Wenn es gelingt, mit einer im freien Zustande ungefärbten Farbbase eine Färbung zu erzielen, welche der physikalischen Extraktion widersteht, so ist dies sicher eine injunktive Färbung.

Nun noch einige Worte über die Art und Weise, wie der insorptive und injunktive Färbeprozess im Einzelnen verläuft.

Bei der insorptiven Färbung ist die innere Ursache der Färbung einfach der osmotische Druck des gelösten Farbstoffs gegenüber dem Gewebe, als zweites Lösungsmittel betrachtet.

Zum Zustandekommen einer injunktiven Färbung gehört aber noch etwas anderes. Sie ist ein Umlagerungsprozess von salzartigen Verbindungen, und wir werden sie heute nur unter Zugrundelegung der Dissociationsgesetze verstehen können.

Bezeichnen wir mit *Fb* eine beliebige Farbbase, so werden wir das Salz, welches sie mit *HCl* eingeht, summarisch schreiben können: $Fb \,.\, HCl$, ebenso wie $NH_3 + HCl$ sich, was die summarische Formel anbetrifft, einfach addiert. In der That werden in einer wässerigen Lösung die Moleküle des Farbsalzes zu einem Teil in dieser Weise enthalten sein. Ein anderer Teil der Moleküle ist jedoch in wässeriger Lösung im dissociierten Zustand, als Doppelmoleküle, vorhanden und zwar

1) im Zustande der hydrolytischen Dissociation, als

$$Fb + HCl,$$

2) im Zustande der elektrolytischen Dissociation in Form der beiden entgegengesetzt elektrisch geladenen Jonen

$$\overset{+}{Fb}H + \overset{-}{Cl}.$$

Bei einer Umlagerung der Salzkomponenten, wie es die injunktive Färbung ist, ist der einzige aktive Bestandteil das Farbbasen-Jon $\overset{+}{Fb}H$. Dieses allein ist befähigt, mit der sauren Gruppe des Gewebes die Salzbildung einzugehen. In dem Masse, wie es vom Gewebe in Beschlag genommen wird, regeneriert es sich aus dem undissociert gebliebenen Farbsalz durch Dissociation desselben wieder. Daraus geht hervor, dass die „Färbekraft“ eines Farbstoffs durchaus kein vager, unmessbarer Begriff ist, sondern eine messbare Grösse, welche direkt proportional ist der Grösse der elektrolytischen Dissociation

des Farbsalzes. Da nun die Dissociationsgrösse durch Bestimmung z. B. der elektrischen Leitfähigkeit des Salzes zahlenmässig gemessen werden kann, so muss man durch Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit ein direktes Mass für die chemische Färbekraft des Farbstoffes gewinnen können. Leider fehlen experimentelle Versuche hierüber noch ganz.

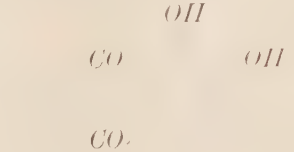
Ich sagte absichtlich: für die chemische Färbekraft; denn die gesamte Färbekraft der injunktiv färbenden Farbstoffe ist nicht nur eine Funktion der Dissociationsgrösse, sondern auch der Diffusibilität des Farbstoffes oder der Farb-Jonen in das Gewebe.

Da nun alle Salze in Alkohol bedeutend geringer elektrolytisch dissociiert sind als in wässeriger Lösung, so folgt daraus, dass auch für die injunktive Färbung, nicht nur für die insorptive, die Färbung aus alkoholischer Lösung ungünstiger ist als aus wässeriger Lösung.

## 2. Die Beizenfärbung.

Unter Beizenfärbung versteht man eine Färbung, bei der man den Farbstoff nicht direkt auf das Gewebe einwirken lässt, sondern erst nach vorausgegangener Behandlung des Gewebes mit einem Körper, welcher den Farbstoff an das Gewebe binden soll. Man kann die Mehrzahl der Farbstoffe zu Beizenfärbungen benutzen; unter einem „Beizenfarbstoff" schlechtweg versteht man jedoch einen Farbstoff, welcher an und für sich kein oder nur ein unbedeutendes Färbevermögen hat und nur mit Hilfe einer Beize als Farbstoff dienen kann, z. B. Alizarin.

Die Beizenfarbstoffe sind durchweg schwach saure Farbstoffe und haben, soweit ihre Constitution bekannt ist, die gemeinsame Struktureigentümlichkeit, dass in ihrem Molekül 2 Hydroxylgruppen in Orthostellung sich befinden, z. B.:



Alizarin = Dioxyanthrachinon.

Die für dieselben zur Anwendung kommenden Beizen sind die Salze von Schwermetallen, besonders Eisen, Chrom, Zinn, Aluminium, Kupfer.

Die Verbindung eines Beizenfarbstoffs mit einem Schwermetall, welche natürlich auch im Reagenzglas herzustellen ist, nennt man einen Lack und spricht demgemäss von dem Eisen-Haemateïnlack, Chrom-Alizarinlack u. s. w. Häufig werden gleichzeitig zwei Beizen angewandt: Chrom-Eisen-Haemateïnlack u. s. w.

Die eigentlichen Beizenfarbstoffe haben die Eigentümlichkeit, dass die Lacke, welche sie mit den verschiedenen Metallen bilden, fast alle eine andere Farbe haben; sie sind „polygenetisch“. Z. B. ist der Eisen-Alizarinlack tiefbraun, der Aluminium-Alizarinlack rot; der Eisenhaemateïnlack blauschwarz, der Aluminiumhaemateïnlack blauviolett. Die anderen sauren Farbstoffe bilden zwar auch mit zahlreichen Schwermetallen unlösliche, den Lacken zu vergleichende Verbindungen, haben aber stets nur eine Farbe: alle Salze des Eosins sind rot, als Pikrate gelb.

Nicht jeden Farbestoff, welcher mit Schwermetallen unlösliche Verbindungen giebt, kann man zur Beizenfärbung verwenden; und nicht jede unlösliche Verbindung eines Farbstoffs mit irgend einem Schwermetall hat die färberischen Eigenschaften eines Lackes. Z. B. sind fast alle Baryumsalze der Farbsäuren unlöslich, und doch kann man Baryumsalze nicht als Beize für saure Farbstoffe brauchen. Bei der der Färbung nachfolgenden Auswaschung würden die Baryumlacke einfach mechanisch wieder abgespült werden, sie „färben“ nicht. Zum Zustandekommen einer Beizenfärbung gehört erstens, dass das Metallsalz, welches als Beize benutzt wird, vom Gewebe festgehalten wird. Wahrscheinlich spielt auch hier die starre Lösung eine Rolle, wenn auch in vielen Fällen unzweifelhaft wirkliche chemische Prozesse bei der Beizung vor sich gehen. Zweitens muss der entstehende Lack von dem Gewebe in starrer Lösung festgehalten werden.

Wie man für saure Farbstoffe eine basische Beize (Metalloxyde) benutzt, so wirkt für basische Farbstoffe eine Säure als Beize, wenn sie mit der Farbbase eine unlösliche Verbindung giebt. Als solche hat die Gerbsäure die grösste Bedeutung, weil sie einerseits in vorzüglichem Masse die Bedingung einer Beize erfüllt, dass sie von vielen Geweben mit grosser Intensität festgehalten wird, und andererseits mit allen basischen Farbstoffen unlösliche oder schwerlösliche Salze bildet.

Auf der Beizung mit Gerbsäure beruht z. B. die Löffler'sche Färbung der Geisseln der Bakterien.

Bei der Gerbsäurebeizung besteht die auffallende Thatsache, dass die Färbung intensiver und haltbarer wird, wenn man die Beize vor der Einwirkung des eigentlichen Farbstoffs „fixiert“, d. h. in ein anderes unlösliches Salz umwandelt. Wenn man nach beendeter Beizung mit Tannin eine Lösung eines Ferrisalzes einwirken lässt, bildet sich auf der Faser zunächst schwarzes gerbsaures Eisenoxyd, welches fest an der Faser haftet. Lässt man dann Fuchsin einwirken, so setzt sich das gerbsaure Eisenoxyd mit dem Fuchsin um, und es entsteht allmählich gerbsaures Fuchsin, welches merkwürdiger Weise dann viel besser haftet als bei direkter Färbung. Eine Erklärung für diese Thatsache zu geben, ist kaum möglich und liegt uns auch ferner,

weil diese Beizenfärbungen in der Histologie eine sehr untergeordnete Rolle spielen, so wichtig sie auch in der Färbeindustrie sind. Hier benutzt man zur Fixierung der Gerbsäure meist Brechweinstein.

Die eigentlichen Beizenfarbstoffe verhalten sich gegenüber den Metallsalzen, mit denen sie Lacke bilden, verschieden. Ich möchte die Beizenfarbstoffe nach diesem Gesichtspunkte in zwei grosse Gruppen einteilen:

1) Beizenfarbstoffe, welche nur mit Metalloxyden oder basischen Metallsalzen Lacke bilden. Die Lacke dieser Farbstoffe sind alle in Wasser unlöslich. Der Hauptrepräsentant dieser Gruppe ist das Alizarin. Um einen Alizarinlack mit Aluminium zu erzeugen, genügt es nicht, Alizarin und Alaun in wässeriger Lösung zusammenzubringen; selbst beim Kochen lagern sich diese Körper nicht zum Thonerde-Alizarinlack um. Dagegen liefert das Alizarin mit basischen Aluminiumsalzen ohne weiteres[1]) den schön rot gefärbten in Wasser völlig unlöslichen Thonerdelack.

Aus Alaun und Alizarin erhält man im Reagenzglas erst nach Hinzufügen von Natronlauge den Lack.

2) Beizenfarbstoffe, welche schon mit neutralen Metallsalzen Lacke bilden. Diese Lacke sind alle in Wasser löslich. Man bezeichnet die Lösungen der Lacke auch als Tinten. Es ist deshalb ratsam, aus der Klasse der Beizenfarbstoffe im weiteren Sinne, diese Klasse als Tintenfarbstoffe herauszugreifen. Hierhin gehört das Haematoxylin und seine Derivate sowie das Carmin. Eine wässerige Lösung von Haematoxylin, besser noch von Haemateïn, giebt mit neutralem Alaun sofort einen violetten Lack, ohne dass man nötig hätte, Natronlauge hinzuzufügen; und dieser Lack ist in Alaunlösung löslich, also eine Tinte. Diese Eigenschaft bewirkt, dass man die Färbeprozedur mit derartigen Farbstoffen abkürzen kann. Statt das Gewebe zunächst mit der Beize zu durchtränken und den Farbstoff nachträglich einwirken zu lassen, kann man mit der fertigen Tinte in einer Prozedur färben. So geschieht es bei der Färbung mit Böhmer'schen oder Delafield'schen Haematoxylin.

Die Beizenfarbstoffe sind übrigens nicht nur in Form der Lacke, Schwermetallsalze, im stande zu färben, sondern auch in Form der einfachen Alkalisalze, welche in Wasser löslich sind. Aber diese Färbungen sind sehr unecht und gar nicht mit den Lackfärbungen zu vergleichen.

Zum Schlusse dieses Kapitels möchte ich noch betonen, dass ich den Begriff der Beizenfärbung nicht weiter fassen möchte, als

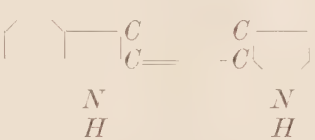
[1]) Statt dessen kann man natürlich den Prozess auch so leiten, dass man mit einem Neutralsalz (z. B. Eisenoxyd-Alaun) beizt und das ausgewaschene Gewebe nachträglich der alkalischen Farblösung (z. B. Alizarin-Natrium) aussetzt.

ich es soeben dem allgemeinen Gebrauch folgend gethan habe. Pappenheim hat in Anlehnung an Unna den Begriff der Beizung auch auf andere Prozeduren ausgedehnt, welche die Färbung erleichtern oder die Färbekraft erhöhen, z. B. den Zusatz von Anilinwasser zum Methylviolett, den Zusatz von Alkali zum Methylenblau. Derartige Prozeduren sind in ihrem Wesen aber doch recht verschieden von der eigentlichen Beizung, und es liegt kein Grund vor, sie mit der echten Beizenfärbung auf eine Stufe zu stellen.

Natürlich liegt kein sachlicher Grund vor, der Pappenheimschen Auffassung entgegenzutreten, sondern es handelt sich nur um die Präcision des Begriffes der Beizung. Bezeichnet man mit diesem Namen alles das, was Pappenheim darunter versteht, so verliert der Begriff viel von seiner Schärfe. Ich verlange zum Begriff der Beizenfärbung stets 2 Componenten: 1) die Beize, 2) den Farbstoff, und ferner die chemische Bindung der beiden Componenten zu einem Lack.

### 3. Theorie der Küpen- und Entwickelungsfärbungen.

Wenig Bedeutung haben für die Histologie die Küpen- und Entwickelungsfärbungen. Der Typus der Küpenfärbung ist die Indigoblaufärbung. Indigo ist ein im Wasser unlöslicher Körper, der zwar eine chromophore Gruppe, $C=C$, aber keine salzbildende Gruppe enthält,



also nach obigen Definitionen nur ein Chromogen ist. Durch Reduktionsmittel wird er durch Aufnahme von 2 *H*-Atomen in das in Alkalien lösliche Indigoweiss übergeführt. Dieses enthält zwei salzbildende Gruppen *(OH)* und wird von den Geweben wie ein Farbstoff festgehalten. Man lässt also eine alkalische Lösung von Indigoweiss (die „Küpe“) auf die Gewebe einwirken und setzt sie nachträglich der Oxydation durch die Luft aus. Dann bildet sich Indigoblau, welches mechanisch in den intermolekularen Lücken der Faser haften bleibt. Es handelt sich hier, im Gegensatz zu den anderen Färbungen, nicht um eine starre Lösung.

Die Entwickelungsfärbungen beruhen darauf, dass man das Gewebe mit einer Substanz durchtränkt, welche durch nachträgliche Oxydation oder Reduktion auf der Faser selbst in einen Farbstoff verwandelt wird. Für uns hat diese Färbungsmethode insofern Bedeutung, als man nach Ehrlich aus Gemengen von aromatischen Diaminen und Phenolen oder anderer ähnlicher Körper im lebenden Organismus selbst durch die vitale Reduktion und Oxydation Farbstoffe erzeugen kann und so den Nachweis der Reduktions- oder Oxydationstüchtigkeit der einzelnen Organe führen kann. Zu den Entwickelungsfärbungen gehören auch diejenigen Methoden, bei denen ein Azofarbstoff auf der Faser selbst entwickelt wird.

## IV. Die vitale Färbung.

Unter vitaler Färbung versteht man die Färbung irgendwelcher Gewebe oder Zellbestandteile während des Lebens der Zelle, gleichgiltig ob dabei ein wirklich mit Lebensfunktion behafteter protoplasmatischer Teil der Zelle oder ein lebloser Einschuss der Zelle von „paraplasmatischer" Natur gefärbt wird. Es kommt dabei nicht auf das Leben des Gesamtorganismus an, sondern es können auch „überlebende" Zellen vital gefärbt werden. Um aber eine Färbung als vital bezeichnen zu können, muss man unbedingt zweifellose Beweise dafür haben, dass die Zelle nach der Färbung noch Lebenserscheinungen zeigt. Dabei kommen folgende 2 Kriterien des Lebens in Betracht.

1. Die Eigenbewegung, soweit es sich um Flimmerepithelzellen, amöboid bewegliche Zellen oder um eigenbewegliche einzellige Organismen handelt.

2. Die Reduktionskraft der Zelle. Die Eigenbewegung ist ein so sicheres Zeichen des Lebens, dass über dieses Kriterium kein weiteres Wort zu verlieren ist. Dagegen ist die reduzierende Kraft der lebenden Zelle einer genaueren Besprechung bedürftig. Wie schon in der „allgemeinen Farbstoffchemie" gesagt worden ist, haben fast alle Farbstoffe die gemeinsame Eigenschaft, dass sie durch Reduktionsmittel in farblose Verbindungen, die Leukokörper übergeführt werden können. Die reduzierende Kraft der Zelle bewirkt dasselbe. Auch sie ist im stande, Farbstoffe zu entfärben, eine Thatsache, welche von Ehrlich zuerst beobachtet worden ist. Die Reduktionskraft der Zelle ist der Ausdruck ihres Sauerstoffbedürfnisses. Bei reichlicher Zufuhr von $O$ ist die Reduktionskraft der Zelle gering, bei $O$-Mangel wächst sie und bei $O$-Abschluss steigt sie ganz bedeutend. Allerdings nur für kurze Zeit, denn lange vermag die Zelle ohne $O$ nicht zu leben. Die Reduktion der Farbstoffe besteht in der Aufnahme mehrerer (meist 2) $H$-Atome, welche sie dem $H_2O$ entreisst. Den dabei frei werdenden $O$ nimmt die Zelle auf. Für gewöhnlich ist natürlich ein Farbstoff nicht im stande, dem $H_2O$ die $H$-Atome zu entreissen. Wenn aber gleichzeitig ein Körper zugegen ist, welcher den dabei frei werdenden $O$ zu binden im stande ist, so tritt diese Reaktion ein.

Die Reduktion eines Farbstoffes besteht also nicht etwa in der Abgabe von *O*-Atomen, sondern in der Aufnahme von *H*-Atomen, denn auch solche Prozesse bezeichnet man als Reduktion.

Der Zweck einer vitalen Färbung kann ein doppelter sein; entweder ein histologischer. Durch die Elektion, welche einige Farbstoffe für gewisse Gewebselemente besitzen, erreicht man eine Färbung dieser Elemente, welche am fixierten Objekt oft nicht gelingt, z. B. die vitale Färbung der Nervensubstanz durch Methylenblau, oder die Färbung gewisser fädchenartiger Gebilde in den Epithelzellen der Speicheldrüse durch Diazingrün. Oder der Zweck der vitalen Färbung ist ein physiologischer, das Studium der Grösse der reduzierenden Kraft, d. h. des Sauerstoffbedürfnisses der einzelnen Gewebe oder Organe. Je nachdem man nun den einen oder den anderen Zweck verfolgt, wechselt auch die Methodik und die Auswahl der Farbstoffe. Ich zähle deshalb zunächst die verschiedenen Methoden auf, welche uns überhaupt zu Gebote stehen, um einen Farbstoff mit der lebenden Zelle in Berührung zu bringen und bespreche dann getrennt die Methodik und die Resultate der vitalen Färbung a) zu physiologischen, b) zu histologischen Zwecken.

Die Methoden, um Farbstoffe auf die lebende Zelle einwirken zu lassen, sind folgende:

1. bei einzelligen Lebewesen oder bei Zellen höherer Organismen, welche ausser Verband mit den anderen Zellen ohne weiteres zu leben vermögen, wie Spermatozoen und Leukocyten, genügt es, den Farbstoff in hinreichender Verdünnung in einer isotonischen Flüssigkeit zu lösen und von dieser Lösung einen Tropfen dem zellhaltigen Präparat zuzusetzen. Eine isotonische Flüssigkeit für Bakterien ist je nach der Art des Bakterium Leitungswasser oder Nährbouillon, auch Kochsalzlösung. Für Zellen von Amphibien 0,6 % Kochsalzlösung, für Zellen von Säugetieren 0,85 % Kochsalzlösung.

2. Statt dessen kann man den Farbstoff auch in fester Form an die Zelle bringen (Pappenheim, Nakanishi). Zu diesem Zwecke trocknet man am besten einen Tropfen einer entsprechend verdünnten Farblösung auf dem Deckglas an und bringt das zu untersuchende Material auf dieses Deckglas.

3. Um überlebende Organe höherer Tiere zu färben, legt man sie einige Zeit in eine Schale, welche reichlich mit einer entsprechend dünnen Lösung des Farbstoffes in einer isotonischen Kochsalzlösung gefüllt ist. Es dürfen dazu nur sehr kleine und aufs feinste zerzupfte Stückchen der Organe verwandt werden.

4. Der Farbstoff kann dem lebenden Tier einverleibt werden und zwar

a) durch Verfütterung auf dem Wege der Resorption vom Darmkanal aus,

b) durch subkutane Injektion, also auf dem Lymphwege,

c) durch intravasculäre Injektion, entweder durch einmalige Injektion einer stärkeren Farbstofflösung in die Venen, allenfalls ins Herz, oder durch allmähliche tropfenweise intravenöse protrahierte Infusion einer dünneren Farblösung unter constantem Druck.

5. Wassertiere nehmen auch Farbstoff an, wenn man dem Aquariumwasser in passender Concentration Farbstoff zusetzt und die Tiere in dem gefärbten Wasser längere Zeit leben lässt.

## 1. Die vitale Färbung zu physiologischen Zwecken.

Die Messung der reduzierenden Kraft der verschiedenen Zellen beruht darauf, dass die Leichtigkeit der Reduktionsfähigkeit bei verschiedenen Farbstoffen verschieden gross ist. Auch bei ein und demselben Farbstoff ist die Reduzierbarkeit von verschiedenen Faktoren abhängig und mit ihnen wechselnd, besonders von der Alkalescenz und der Acidität ihrer Lösung. So ist z. B. Methylenblau und besonders Neutralrot in saurer Lösung schwerer zu reduzieren als in alkalischer. Wenn man eine etwa $^1/_2{}^0/_0$ Lösung von Methylenblau im Reagenzglase mit einer kleinen Messerspitze Zinkstaub schüttelt, bleibt sie noch längere Zeit blau, sobald man aber etwas *Na OH* zufügt, entfärbt sie sich sofort. Umgekehrt ist auch Leukomethylenblau, wie fast alle leicht verküpenden Leukokörper in alkalischer Lösung viel sauerstoffgieriger als in neutraler oder saurer. Für die vitalen Färbungen kommt nun nur der leichte Alkalescenzgrad der tierischen Flüssigkeiten in Betracht, bei Bakterienkulturen die entsprechende leichte Alkalinität der Nährböden. Für so leicht alkalische Flüssigkeiten, welche ihre Alkalescenz nicht so sehr der Gegenwart von freien Alkalien, als vielmehr von alkalisch reagierenden Phosphaten und höchstens Carbonaten verdanken, kann man folgende kleine Skala von Farbstoffen aufstellen, welche von den leichter reduzierbaren zu den schwerer reduzierbaren aufsteigen:

Methylenblau, Safranin, Neutralrot, Methylviolett.

Ich möchte hier den Begriff des Reduktionswiderstandes einführen. Obige Farbstoffe sind nach steigendem Reduktionswiderstand geordnet. Das Reduktionsprodukt des Methylenblau, Safranin und Methylviolett ist farblos. Das Neutralrot wird dagegen zu einem leicht hellgelben Körper reduziert. Wenn es sich darum handelt, die Reduktionskraft von Bakterien zu prüfen, so braucht man von diesen Farbstoffen nur etwas dem Nährboden hinzuzufügen. Die Herstellung solcher gefärbten Nährböden erfordert aber noch besondere Cautelen.

Wenn man Bouillon, Gelatine oder Agar vor der Sterilisation mit Farbstoff beschickt, so werden die leichter reduzierbaren Farbstoffe in der Siedehitze während der Sterilisation vom Nährboden selbst reduziert. Man kann sie reoxydieren, indem man nach der Sterilisation die in die Reagenzgläser abgefüllten Mengen kräftig mit Luft durchschüttelt. Das geht aber natürlich nur bei reoxydablen Farbstoffen. Aber es ist in Bezug auf Sterilhaltung ebenso sicher, wenn man zu der fertig abgefüllten Bouillon oder dem noch flüssigeren Agarröhrchen mit einer sterilen Pipette oder Platinöse von einer wässerigen Lösung des Farbstoffes soviel hinzufügt, dass der Nährboden gerade deutlich gefärbt ist. Eine starke wässerige Farblösung ist eo ipso steril, denn alle Farbstoffe sind in hoher Concentration Protoplasma- und Bakteriengifte. Bei Reduktionsversuchen hat man also auch darauf zu achten, dass der Farbstoff in so starker Verdünnung zugegen ist, dass er nicht mehr giftig wirkt. Der ungiftigste von den aufgezählten Farbstoffen ist das Neutralrot, dann das Methylenblau. Viel giftiger sind Saffranin und Methylviolett. Wenn man dem Nährboden nur soviel Farbstoff zusetzt, dass er gerade eben deutlich gefärbt ist, so hat selbst das Methylviolett keinen erheblichen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien. Durch Untersuchung von Raab und v. Tappeiner ist festgestellt worden, dass die fluorescierenden Farbstoffe im Lichte, wo sie ihre Fluorescenz entfalten können, viel giftiger sind als im Dunkeln.

Die reduzierende Kraft der Bakterien äussert sich darin, dass nach hinreichender Zeit der Nährboden entfärbt ist, bezw. bei Zusatz von Neutralrot ganz hellgelb wird. Da nun die bisher aufgezählten Farbstoffe leicht verküpen, so stellt sich die Farbe sofort wieder her, wenn man Luft hinzutreten lässt, also in Bouillon schon beim Durchschütteln, in Agar, wenn man das Reagenzglas zerbricht und den Nährboden zerschneidet. Die reduzierende Kraft der Bakterien kann so gross sein, dass sie den Farbstoff selbst bei Luftzutritt reduzieren; in anderen Fällen tritt die Reduktion nur bei Luftabschluss ein. Im letzten Falle bleibt der oberste Rand der Nährbouillon auch ohne Umschütteln gefärbt. Wenn man das vermeiden will, so muss man den Nährboden mit einer gegen Luft abschliessenden Substanz überschütten. Bei horizontaler Oberfläche des Nährbodens eignet sich dazu am besten Paraffinum liquidum, sonst Agar.

Es giebt aber Farbstoffe, deren stattgehabte Reduktion man auf jeden Fall erkennt, auch wenn nachträglich Sauerstoff hinzugekommen ist. Das sind die nicht verküpenden Farbstoffe. Der brauchbarste von diesen ist Diazingrün (Diäthylsafranin-azodimethylanilin). Es ist sehr leicht reduzierbar und wird dabei zunächst in einen roten Farbstoff verwandelt, indem es sich bei der Reduktion in das rote Diäthyl-

safranin und das farblose Dimethylparaphenylendiamin spaltet. Bei weiterer Reduktion wird auch das Diäthylsafranin in seine farblose Leukoverbindung verwandelt. Bei nachträglicher Oxydation an der Luft wird dieser Leukokörper wieder zu Diäthylsafranin und es tritt Rotfärbung ein. Dagegen stellt sich die grüne Farbe nicht wieder her. Wenn also einmal eine Reduktion stattgefunden hat, so wird die Lösung rot oder farblos sein, niemals aber kann sie wieder grün werden. Deshalb ist dieser Farbstoff aufs äusserste geeignet zur Erkennung einer stattgehabten Reduktion.

Etwas anderes ist es, wenn man die reduzierende Kraft der Gewebe der höheren Tiere studieren will. Zu diesem Zweck muss man eine grössere Menge des Farbstoffes in wässeriger Lösung subkutan oder intravenös injizieren und deshalb besonders auf die Giftigkeit des Farbstoffes Rücksicht nehmen. Safranin und Methylviolett sind wegen ihrer hohen Giftigkeit nicht zu brauchen. Viel besser ist das Neutralrot, welches ausserordentlich ungiftig ist; aber dieser Farbstoff hat eine ganz besondere Vorliebe für gewisse Gewebselemente, wie wir unten sehen werden, so dass er zur Hervorrufung einer allgemeinen Färbung nicht der geeignetste ist. Ebenso steht es mit Methylenblau. Ehrlich hat in seinen klassischen Untersuchungen Indophenol und Alizarinblau angewandt; das erste als Typus eines leicht reduzierbaren, das zweite als Typus eines schwer reduzierbaren Farbstoffes.

Vorzüglich ist für einen blossen Reduktionsversuch Brillant-Kresylblau R geeignet. Es ist leicht löslich, färbt alle Gewebe diffus und hat zu keinem Gewebsbestandteil eine besondere Affinität. Wenn man 1 ccm einer gesättigten Lösung dieses Farbstoffes einer Maus subkutan injiziert, so wird nach kurzer Zeit Conjunktiva und Zunge blau. Nach $^1/_2$ Stunde töte man das Tier. Nimmt man nun die einzelnen Organe heraus, so sind sie zunächst farblos, werden aber an der Luft rasch tief blau. Am wenigsten Farbstoff hat die Leber aufgespeichert. Das Gehirn hat noch die Eigentümlichkeit, dass nach der Verküpung die Rinde violett, die Marksubstanz blau wird. Das ist nur als metachromatische Färbung zu denken.

Natürlich giebt es auch viele andere Farbstoffe, mit denen man einen solchen Reduktionsversuch ausführen kann.

Die Farbstoffreaktionen sind aber andererseits auch geeignet, die oxydativen Vorgänge im Organismus zu demonstrieren.

Ehrlich hat nachgewiesen, dass das Gemisch eines Diamins und eines Phenols im Tierkörper zu einem Indophenol oxydiert wird. Über die Einzelheiten dieser Reaktion muss ich auf Ehrlich, das

Sauerstoffbedürfnis des Organismus,[1]) verweisen, eine Monographie, welche eine wahre Fundgrube für die mannigfaltigsten Thatsachen und Methoden darstellt, die von den Physiologen bis heute noch durchaus ungenügend verwertet sind.

## 2. Die vitale Färbung zu histologischen Zwecken.

Manche Farbstoffe haben die Eigentümlichkeit, bei der vitalen Einwirkung elektiv zu färben, d. h. sie bevorzugen gewisse Gewebselemente, so dass sie zur histologischen Darstellung derselben geeignet sind. Die geschichtlich älteste vitale elektive Färbung ist die der Nervenfasern und Ganglienzellen mit Methylenblau, welche Ehrlich im Jahre 1887 entdeckt hat. Ehrlich fand, dass, wenn er einem Frosch eine Methylenblaulösung in die Bauchvene infundierte, sich die Axenzylinder und Ganglienzellen blau färbten. Die Methodik der Methylenblaufärbung des Nervensystems ist von den Histologen weiter ausgearbeitet worden. Dogiel gab eine Methode an, die Färbung zu fixieren, indem er das Methylenblau durch nachträgliche Einwirkung von pikrinsaurem Ammoniak in das unlösliche Pikrat verwandelte. Bethe fand eine Methode, um Dauerpräparate zu erhalten, die im Gegensatz zu der Dogiel'schen, alle Prozeduren der Paraffin- oder Celloidineinbettung vertragen. Er benutzte zum Fixieren der Färbung molybdänsaures Ammoniak. Das molybdänsaure Methylenblau, welches dabei entsteht, ist in Wasser ebenso wie in kaltem Alkohol so gut wie unlöslich. Bethe nimmt deshalb diese Prozeduren unter Eiskühlung vor, wodurch gleichzeitig erreicht wird, dass die reduzierende Kraft des überlebenden Gewebes auf ein Minimum reduziert wird. Gleichfalls der reduzierenden Kraft der Gewebe entgegen arbeitet der von Bethe angegebene Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd, welcher das Ammoniummolybdat in Ammoniumpermolybdat verwandelt.

Die Methylenblaumethode eroberte sich bald den ihr gebührenden Rang und ist nahe daran, ihre Konkurrenzmethode, die Schwärzung der Nervensubstanz mit Silbersalzen, aus dem Felde zu schlagen, weil sie sicherere und sauberere Resultate giebt.

Es ist eigentümlich, dass die verschiedenen Tiere nicht in gleicher Weise auf die Methylenblauinjektionen reagieren. Junge Tiere sind für die Färbung der Nerven stets geeigneter als alte. Stets ist die intravasculäre Injektion der subcutanen vorzuziehen, in den meisten Fällen gelingt die Färbung nur intravasculär. Am geeignetsten für die subcutane Injektion ist nach S. Meyer das Meerschweinchen.

Da das Methylenblau leicht reduziert wird und leicht wieder verküpt, so wird man die Färbung der Nervenfasern dadurch noch

[1]) Berlin, Hirschwald, 1885.

bedeutend verstärken, dass man nach beendeter Tötung des Tieres die Organe in möglichst flache Scheiben zerschneidet und der Luft aussetzt.

Statt der Injektion mit Methylenblau kann man auch die überlebenden Organe in dünnen Methylenblaulösungen färben. Die dazu geeignetste Konzentration ist etwa 1 : 20000 physiologischer Kochsalzlösung. Ein sehr geeignetes Objekt zur Demonstration der Färbung ist der Darm eines möglichst kleinen Tieres, am besten der Maus. Ein Stück des Darmes wird für $^1/_2$—1 Stunde in die Farblösung gelegt, dann der Länge nach aufgeschnitten, auf einen Objektträger mit der Serosa nach oben gelegt und ein Deckglas unter leichtem Druck aufgelegt, welches an seinen Ecken mit möglichst dickem Gummi arabicum versehen ist, um das Deckglas in seiner Lage festzuhalten. Den etwas breit gequetschten Darm kann man mit der Immersionslinse der ganzen Dicke nach durchmustern und erhält prachtvolle Bilder der sympathischen Darmgeflechte.

Nach Dogiel erreicht man auch gute Methylenblaufärbungen, indem man Stückchen des Centralnervensystems mit einer Methylenblaulösung 1 : 1500 betupft und in der feuchten Kammer eine Weile stehen lässt. Jedoch möchte ich bemerken, dass nicht alles das, was Dogiel mit Methylenblau gefärbt hat, den Kriterien der vitalen Färbung stand hält. Bei der vitalen Färbung zeigt z. B. die Ganglienzelle eine durchaus homogene Beschaffenheit. In diesem Zustande ist die Zelle auch noch im stande, den Farbstoff zu reduzieren. Die später eintretenden Färbungen, welche die genaueren Strukturen der Ganglienzelle enthüllen, sind nicht mehr als vital zu deuten, weil sie nicht mehr reduziert werden.

Das Methylenblau ist nicht der einzige Farbstoff, welcher vital die Axencylinder färbt, aber es ist bei weitem der geeignetste für diesen Zweck, weil er gleichzeitig eine hohe Wasserlöslichkeit mit einer maximalen Elektion für die Nervensubstanz verbindet.

Zunächst haben einige dem Methylenblau chemisch nahe verwandte Farbstoffe, wie das Thionin, wenn auch in geringerem Masse, die Eigenschaft, Nervensubstanz zu färben. Ihrer allgemeinen Einführung steht ihre geringe Löslichkeit entgegen.

Es gelang mir ferner, in einer ganz anderen Farbstoffklasse nervenfärbende Farbstoffe zu finden. Das sind die Safranin-azofarbstoffe; diese enthalten zwei Chromophore im Molekül, es sind gleichzeitig Safranin- und Azofarbstoffe. Sie werden dargestellt, indem man eine freie Amidogruppe eines Safraninfarbstoffes diazotiert und an ein Amin oder Phenol kuppelt. Der beste von den hierher gehörigen Farbstoffen ist das Diazingrün (Kalle) [Janusgrün (Höchst)]. Dieser Farbstoff ist aber recht wenig dazu geeignet, die Axencylinder

bei der subkutanen oder intravasculären Injektion zur Anschauung zu bringen. Das liegt daran, dass er nicht verküpbar ist. Bei der Reduktion wird er in Dimethylsafranin und Dimethylparaphenylendiamin gespalten und erhält infolgedessen zunächst die rote Farbe des Dimethylsafranins, späterhin wird auch dieses Safranin zu seinem farblosen Leukokörper reduziert. An der Luft verküpt dieser wieder zu dem roten Safranin, aber die grüne Farbe ist nicht wieder herzustellen. Da das Safranin gar keine Verwandtschaft zur Nervenfaser hat, so ist die Nervenfärbung mit dem Beginn der Reduktion für immer verloren.

Aus dieser Thatsache ergiebt sich ein wichtiges allgemeines Prinzip für die vitalen Färbungen: Die Injektionsmethoden (subkutan, intravenös) sind mit Vorteil nur bei verküpenden Farbstoffen zu verwenden. Bei den nicht verküpenden Farbstoffen besitzt die Überlebend-Färbung den Vorteil vor der Injektionsfärbung, dass eine Reduktion vermieden werden kann.

Wenn man einem Tiere Methylenblau injiziert, so wird dieses z. T. im Organismus reduziert, das erkennt man schon daran, dass nach Einnahme von Methylenblau der Harn das Methylenblau z. T. in Form von Leukomethylenblau enthält, dass also der frische Harn beim Schütteln mit Luft oder beim längeren Stehen an der Luft an Farbtiefe zunimmt.

Das Leukomethylenblau hat aber keine spezifische Verwandtschaft zu den Nervenfasern und diffundiert deshalb in das Gewebe hinein. Das nun bei der weiteren Resorption nachfolgende Methylenblau wird zunächst wieder in die Nervenfasern gehen, zum andern Teil aber schon vorher, zum dritten Teil nachher infolge der wiederum eintretenden Reduktion zu Leukomethylenblau das Gewebe diffus imbibieren. Daraus resultiert eine Überschwemmung des Gewebes mit Leukomethylenblau. Wenn man nun nach dem Tode des Tieres die Organe der Verküpung an der Luft aussetzt, so wird das reichlich im Gewebe aufgenommene Leukomethylenblau wieder zu Methylenblau oxydiert und diffundiert dabei wieder in die Nervenfasern hinein, entsprechend seiner grossen Affinität zu diesen. Wir können somit zwei Arten der Färbung der Nervenfaser mit Methylenblau unterscheiden:

1. die direkte Färbung, welche das injizierte Methylenblau selbst erzeugte,

2. die indirekte Färbung, welche durch Reduktion des injizierten Methylenblaus und nachträglicher Verküpung an der Luft zu stande kommt.

Es ist klar, dass die direkte Färbung wegen der fortwährend stattfindenden Reduktion niemals eine gewisse Intensität überschreiten kann, dass dagegen die indirekte Färbung ihr Maximum erst dann

erreicht hat, wenn alles Leukomethylenblau oxydiert ist, oder wenn die Nervenfasern ein Maximum von Methylenblau aufgenommen haben. Deshalb ist die indirekte vitale Färbung für histologische Zwecke viel wertvoller als die direkte, ist aber nur bei verküpenden Farbstoffen möglich.

Da aber auch einige nicht verküpende Farbstoffe für die vitale Färbung unersetzliche Eigenschaften besitzen, so wird man bei der Anwendung dieser gezwungen sein, stets direkt zu färben; da bei der Injektionsmethode durch Reduktion grosse Farbstoffverluste eintreten können, so ist die Überlebendfärbung bei den nicht verküpenden Farbstoffen im allgemeinen der Injektionsfärbung vorzuziehen.

Was nun den positiven Wert der vitalen Färbung betrifft, so muss man im allgemeinen anerkennen, dass die Methode der vitalen Färbungen unhandlicher und nicht so absolut zuverlässig ist, wie die Methode der Färbung des fixierten Objektes. Ausserdem muss man lernen, die Kunstprodukte, welche die vitale Methode in ebenso reichem Masse wie die anderen Methoden schaffen kann, zu erkennen. In den Fällen also, wo wir durch Färbung des fixierten Objektes dasselbe erreichen, wie durch vitale Färbung, werden wir, wenn es sich um einen morphologischen Zweck handelt, stets die Färbung des fixierten Objektes vorziehen. Wohl aber kann die vitale Färbung auch in solchen Fällen ein hohes biologisches Interesse haben, indem aus der Vital-Färbbarkeit doch mancher Schluss auf die Beschaffenheit des Objektes gezogen werden kann. Dagegen giebt es eine Reihe von vitalen Färbungen, welche durch eine Färbung des fixierten Objektes entweder gar nicht oder unvollkommener erreicht werden können; in diesen Fällen ist natürlich die vitale Färbung unersetzlich. Jedoch hat die Histologie erst dann einen rechten Nutzen davon, wenn es gelingt, die Färbungen zu konservieren und Dauerpräparate von ihnen herzustellen. Denn mit dem Aufhören des Lebens der Zelle geht die vitale Färbung stets verloren mit einer einzigen Ausnahme. Wenn man nämlich die körnigen Einschlüsse der Bakterien vital färbt und dann rasch auf dem Deckglas antrocknen lässt, so bleibt die Färbung erhalten, sonst aber diffundiert der Farbstoff nach dem Absterben der Zelle stets in diejenigen Elemente hinein, welche er als tote Gebilde färbt. So z. B. färben sich in der Leberzelle vital mit Methylenblau zahlreiche Körnchen, welche das Protoplasma dicht erfüllen, den Kern aber aussparen; sobald aber die Zelle abstirbt, so tritt wie in der fixierten Zelle unter Verschwinden der Körnchenfärbung eine Kernfärbung ein, welche bei dem Kernkörperchen beginnt, während das Protoplasma nur eine ganz leichte diffuse Bläuung zeigt. Um eine vitale Färbung zu fixieren, muss man den Farbstoff an Ort und Stelle möglichst schnell in eine unlösliche Verbindung umwandeln; das

erreicht z. B. Bethe bei der Fixation des Methylenblaus durch molybdänsaures Ammonium, welches mit Methylenblau eine in Wasser und Alkohol so gut wie unlösliche Verbindung eingeht:

Methylenblau-Chlorid + Molybdänsaures Ammon =
Molybdänsaures Methylenblau + $Cl \,.\, NH_4$.

Da fast alle vitalen Färbungen mit basischen Farbstoffen stattfinden, so könnte man annehmen, dass auch alle vitalen Färbungen durch diese Methode zu konservieren seien. Das ist aber nicht der Fall; denn schon bei der Besprechung der Beizenfärbung wurde gesagt, dass nicht alle Farbstoffe, welche irgend ein unlösliches Salz bilden, deshalb auch als Beizenfarbstoffe zu gebrauchen seien.

Damit das unlösliche Farbsalz auf der Faser haften bleibt, ist notwendig, dass es eine gewisse Affinität zu dem Gewebe besitzt, in welchem es entsteht, sonst lässt es sich rein mechanisch wieder auswaschen. Das gilt auch von der Fixierung der vitalen Färbungen und dazu kommt noch etwas zweites hinzu: Viele in der lebenden Zelle vorhandenen Granula, welche z. T. ohne jede Färbung, z. T. nach vitaler Färbung sichtbar sind, werden durch die gewöhnlichen Fixationsmittel nicht konserviert, sondern erleiden grobe morphologische Veränderungen, sie verklumpen, verquellen oder zerfallen, jedenfalls geht ihre Struktur verloren und sie sind von dem umgebenden Zellleib nicht mehr zu trennen; es geht also bei der Fixation das Substrat für die Färbung verloren. Wenn man z. B. die auch ohne jede Färbung in den Nierenzellen sichtbaren Körnchen mit Methylenblau oder Neutralrot durch subkutane Injektion vital gefärbt hat, so lässt sich diese Färbung nur im frischen Zupfpräparat erkennen und es giebt bisher keine einigermassen verlässliche Methode, um diese Färbung zu konservieren. Wenn man versucht, die Färbung durch Pikrinsäure zu fixieren, so sieht man, dass die körnige Struktur der Nierenzelle, welche im frischen Zustande vorhanden war, völlig vernichtet ist; das liegt daran, dass Pikrinsäure, ein im allgemeinen vorzügliches Fixierungsmittel, die Nierenkörnchen nicht fixiert, ebensowenig wie Alkohol oder Formalin. Diese Körnchen sind überhaupt nur durch das Altmann'sche neutrale Gemisch von Osmiumsäure und Kaliumbichromat zu fixieren, wo sie nach der von Altmann angegebenen Methode mit Säurefuchsin und Pikrinsäure oder auch durch Eisenhaematoxylin zur Anschauung gebraucht werden können, oder durch die Flemming'sche oder Hermann'sche Flüssigkeit, wo sie nach der Benda'schen Methode gefärbt werden können.

In dem Augenblick, wo sich also das unlösliche pikrinsaure Methylenblau oder Neutralrot bildet, ist das Substrat, an dem es haften soll, verloren gegangen und der entstehende Niederschlag des Pikrates entspricht nicht mehr morphologisch den Körnchen. Anders

bei der Fixierung der Nervenfärbung mit Methylenblau. Pikrinsäure und Molybdänsäure fixiert nicht nur das Methylenblau, sondern auch die Nervenfasern vorzüglich, das Substrat der Färbung bleibt erhalten.

Welche Farbstoffe eignen sich nun zur vitalen Färbung?

Zunächst sind es hauptsächlich die basischen Farbstoffe. Sie haben, auch sonst in chemischer Beziehung mehr charakteristische Merkmale als die sauren. Bei den basischen Farbstoffen kann man viele Klassen unterscheiden, welche in chemischer und färberischer Beziehung von einander abweichen: Safranine, Triphenylmethanfarbstoffe und viele andere mehr. Macht man aus diesen an sich recht verschiedenen basischen Farbstoffen durch Hinzufügen einer Sulfosäuregruppe saure Farbstoffe, so gehen alle ihre spezifischen Eigenschaften verloren. Das ist nicht nur bei den Farbstoffen so. Man vergleiche damit z. B. die Base Anilin. Sie ist ein für den Organismus höchst differenter, giftiger Körper. Die Hinzufügung eines Sulfosäurerestes (Sulfanilsäure) macht aus dem Anilin einen ganz harmlosen Körper, der keine irgend wie spezifischen Eigenschaften in sich trägt. Eine Sulfosäure ist wie die andere.

Damit soll nicht gesagt sein, dass die sauren Farbstoffe überhaupt ungeeignet zur vitalen Färbung sind. Manche Körnchen, wie die der Nierenepithelien, haben sogar zu einigen sauren Farbstoffen Verwandtschaft. Doch sind das nach dem bis jetzt vorliegenden Untersuchungsmaterial Ausnahmen. Die am längsten bekannte vitale Färbung ist die mit dem sauren Farbstoff Indigcarmin (indigosulfosaures Natron), welche bekanntlich die Kerne in den gewundenen Harnkanälchen der Niere zur Anschauung bringt (Heidenhain, Chronczewski). Ob es sich hierbei wirklich um eine primäre Färbung der Kerne im lebenden Zustand handelt, möchte ich stark bezweifeln. Man muss immerhin bedenken, dass, was auch immer in den Nierenzellen vital gefärbt sein mochte, bei der Fixation immer eine Kernfärbung daraus wird, so bald der Farbstoff nur einige Verwandtschaft zum Kern hat.

Ferner habe ich einmal beobachtet, dass nach Injektion des sauren Congorots sich in ausgedehntem Masse in allen Organen die elastischen Fasern, oft bis in recht feine Verzweigung hinein, färben, und dass diese Färbung sogar bestehen bleibt, wenn man durch nachträglichen Säurezusatz an den herausgenommenen Organen die Farbe des Congorot in Blau verwandelt.

Im Übrigen werden die biologisch interessanten vitalen Färbungen alle durch basische Farbstoffe zu stande gebracht. Diejenigen Objekte, welche einer vitalen Färbung zugänglich sind, sind

1. die nervöse Substanz
2. viele im Zellleib enthaltenen Granula.

Bezüglich der vitalen Färbbarkeit des Kernes werden wir noch ausführlicher sprechen müssen.

### a) Die vitale Färbung der nervösen Substanz.

Der geeignete Farbstoff ist das Methylenblau. Die Methode seiner Anwendung wurde oben besprochen.

Ganz ähnliche Eigenschaften zeigen die chemischen Verwandten des Methylenblaus, besonders ein Farbstoff, der statt der 4 Methyl-4 Aethyl-Gruppen enthält, während Thionin und Toluidinblau besonders wegen ihrer geringen Löslichkeit viel weniger dazu geeignet sind.

Ausser den Thiazinen ist eine mit diesen gar keine chemische Verwandtschaft zeigende Farbstoffgruppe befähigt, vital Nerven zu färben, die Safraninazofarbstoffe, und zwar das Diazingrün und Brillant-Diazinblau (Kalle), während einige diesen Farbstoffen sehr ähnliche Körper derselben Reihe keine nervenfärbenden Eigenschaften besitzen. Die Farbstoffe sind nicht verküpbar und sind besonders für die Darstellung der feinsten Nervenverzweigungen in Drüsen zu verwenden. Man färbt kleine zerzupfte Stückchen der Organe etwa $^1/_2$ Stunde lange in einer Lösung von Diazingrün 1 : 30000 0,85 % Kochsalzlösung und betrachtet sie frisch. Man kann die Präparate auch mit Pikrinsäure oder Molybdänsäure fixieren, jedoch ist weder das Pikrat noch das Molybdat des Diazingrüns genügend alkoholunlöslich, um die Präparate ohne Verlust der Färbung zu entwässern. Die Feinheiten des Präparates gehen bei der Fixation zum grossen Teil verloren und es erhalten sich nur die gröberen Nervenfasern. Geeignete Objekte für diese Methode sind die Speicheldrüsen und der Darm kleinerer Tiere (der Maus), welchen man stückweise in toto in die Farbflüssigkeit einlegt, nach beendeter Färbung der Länge aufschneidet und unter das Deckglas bringt. Dieses versieht man an den Ecken mit etwas dicker Gummi arabicum-Lösung und drückt es mittelst eines zweiten Objektträgers an, so dass der Darm etwas gequetscht wird. Nach einiger Zeit tritt unter dem Deckglas Reduktion des Farbstoffes (s. o.) ein, wodurch der Beweis geliefert wird, dass das Organ noch Sauerstoff verbraucht und noch nicht völlig abgestorben ist. Wie auch sonst, wird das Diazingrün hier bei der Reduktion erst rot, wobei es aber die Nervenfasern schon verlässt, und dann farblos.

### b) Die vitale Färbung der Zellkörnchen.

O. Schultze und Mitrophanow zeigten, dass sich in den Darmepithelzellen der Kaulquappe durch Methylenblau körnige Gebilde von grosser Regelmässigkeit zur Anschauung bringen lassen.

Ehrlich fand in dem Neutralrot einen Farbstoff, welcher zu einer grossen Zahl von Zellkörnchen eine maximale Verwandtschaft hat. Besonders Arnold hat dann diese Farbstoffe in ausgedehntem Masse für die Darstellung von Zellkörnchen angewandt.

In dem Diazingrün fand ich ferner einen Farbstoff, welcher wiederum andere, einzig dastehende Affinitäten bei der vitalen Färbung hat.

Dementsprechend wird es rationell sein, von diesen drei wichtigsten Farbstoffen auszugehen.

Es giebt einige Zellkörnchen, welche sehr leicht die verschiedenartigsten Farbstoffe aufnehmen und deshalb ein leichtes Objekt für die vitale Färbung darstellen. Am leichtesten zu färben sind wohl 1. die Körnchen der Nierenepithelzellen, 2. die Körnchen in den Epithelzellen der serösen Häute. Diese Körnchen nehmen nicht nur die 3 eben genannten Farbstoffe auf, sondern auch eine grosse Reihe anderer, vor allem Bismarckbraun.

Eine zweite Klasse von Körnchen hat beschränktere Affinitäten zu Farbstoffen und nimmt nur einen oder zwei der eben genannten drei wichtigsten Farbstoffe auf, und ausser diesen überhaupt keinen anderen Farbstoff, soweit bekannt ist. Dahin gehören die Granula der Leberzellen, welche sich leicht mit Methylenblau, unter Umständen aber auch mit Diazingrün färben, niemals aber Neutralrot aufnehmen. Andererseits nehmen die von mir beschriebenen Randkörnchen der Leberzellen mit grosser Leichtigkeit das Neutralrot, unter Umständen auch das Diazingrün, aber niemals eine Spur Methylenblau oder irgend einen anderen Farbstoff auf. Ferner färben sich die von mir beschriebenen fädchenartigen Gebilde in den Epithelzellen der Speicheldrüsen nur mit Diazingrün, sonst mit keinem Farbstoff (mit Ausnahme des dem Diazingrün sehr nahe stehenden und ihm in allen Stücken gleichenden Brillant-Diazinblau).

Nun hat Nakanishi gefunden, dass auch in den Bakterienleibern körnige Gebilde vorkommen, die sich vital färben. Bei eigenbeweglichen Bakterien ist ja das Kriterium der „vitalen“ Färbung gegeben und eine Täuschung nicht möglich.

Andererseits hat Plato nachgewiesen, dass sich in den Leukocyten alle diejenigen eiweissartigen — organisirten oder unorganisirten — Gebilde mit Neutralrot färben, welche durch Phagocytose aufgenommen worden sind: totes Eiweiss, Bakterien wie der Milzbrandcacillus, der Gonokokkus etc.

Dies führt uns zu der allgemein wichtigen Frage: welche Gewebselemente färben sich im allgemeinen vital? Ist das lebende Protoplasma im stande, Farbstoffe aufzunehmen, oder sind es nur

paraplasmatische, zwischen die Micellen des lebenden Protoplasma eingelagerte Körnchen, wie etwa Sekretkörnchen?

Diese Frage ist nicht einheitlich zu beantworten. Zunächst giebt es Körnchen von unzweifelhaft paraplasmatischer Natur, welche sich vital färben lassen. Das sind z. B. die Zymogenkörnchen des Pankreas.

Andererseits giebt es aber Drüsenkörnchen, von denen man den Zusammenhang mit der Sekretion nicht nachweisen kann, welche bei allen Phasen der Sekretion, bei denen die authentischen Sekretkörnchen die auffälligsten morphotischen Veränderungen durchmachen, genau den gleichen Anblick gewähren. Dahin gehören die Zentralkörnchen (auch die Randkörnchen?) der Leberzelle, die Fädchen der Speicheldrüsen.

Welche Stellung die Körnchen der Nierenepithelien einnehmen, will ich nicht entscheiden. Denn man findet in einer und derselben Niere in verschiedenen Zellen Körnchen von verschiedener Grösse und Zahl, in einer Zelle jedoch stets lauter gleich grosse Körnchen, so dass der Vergleich mit den Zymogenkörnchen des Pankreas nahe liegt. Da man aber eine Ausstossung dieser Körnchen während der Harnsekretion nicht gut annehmen kann (woraus sollten diese Körnchen bestehen? sie müssten einen Bestandteil des normalen Harns darstellen!), so will ich diese Frage nicht entscheiden. Altmann hält allerdings die Harnsekretion auch für einen „granulären" Prozess, einen Prozess, bei dem die Bioblasten der Nierenzelle in Sekretkörnchen umgewandelt und ausgestossen würden: Benda hält die Körnchen der Nierenzelle dagegen für fixe Zellbestandteile.

Ferner giebt es einige körnige Einschlüsse, welche sicherlich tote und sogar körperfremde Bestandteile sind. Wie Plato nachgewiesen hat, färben sich die durch Phagocytose aufgenommenen körnigen Einschlüsse der Leukocyten vital mit Neutralrot.

Und als Kontrast zu diesen Befunden steht die Thatsache, dass die Substanz, die wir als den Träger der kompliziertesten Lebensfunktion ansehen dürfen, das Protoplasma der Ganglienzelle und der Axencylinder, sich vital mit Methylenblau färben.

Nach Nakanishi färben sich die sporogenen Körnchen der sporenbildenden Bacillen, also die Vorstufen der Sporen, ebenfalls vital mit Methylenblau. Diese Körnchen sind sicherlich keine toten Gebilde.

Wenn also Galeotti durch seine Versuche zu dem Schluss kommt, dass nur paraplasmatische Substanz, nicht lebendes Protoplasma im stande sei, sich während des Lebens der Zelle mit Farbstoff zu beladen, so steht dieser Behauptung zum Mindesten die Thatsache der vitalen Färbbarkeit des Nerven gegenüber. Man könnte ja meinen, dass von der Nervenfaser, die aus zwei Substanzen besteht, der Fibrillen- und der Kittsubstanz, sich nur der weniger lebenswichtige Teil, nach

unseren (besonders durch die Bethe'schen Untersuchungen gestützten) Erfahrungen also die Kittsubstanz färbt. Aber Bethe hat gerade nachgewiesen, dass die Färbung an den Fibrillen haftet. Und wenn man nun meint, dass in der Fibrillensubstanz sich nur die indifferenteren Moleküle färbten, das lebende Protoplasma aber jeglicher Färbung einen Widerstand entgegensetze, so ist das eine Behauptung, welche sich objektiv jeder Kritik entzieht und sich weder beweisen noch ablehnen lässt, jedenfalls aber nur von dem Dogma eingegeben ist, das lebende Protoplasma sei unfärbbar.

Es ist vielleicht nicht zufällig, dass in den beiden Fällen von Färbung des eigentlichen Protoplasma, bei der Färbung der Nervensubstanz und der der sporogenen Körnchen, es beidemal das Methylenblau ist, das diese Färbung zu stande bringt, während die Färbung einiger authentischer paraplasmatischer Substanzen, der Zymogenkörnchen des Pankreas und der durch Phagocytose aufgenommenen Eisweisskörnchen (Plato), gerade durch das Neutralrot geschieht.

### c) Die Frage nach der vitalen Färbbarkeit des Zellkerns.

Nachdem wir es soeben abgelehnt haben, ein Dogma von der Unfärbbarkeit lebender Substanz anzuerkennen, werden wir a priori auch die vitale Färbbarkeit des Kerns nicht prinzipiell ablehnen können. Hier tritt aber eine grosse Schwierigkeit hinzu. Wir hatten bei der vitalen Färbung protoplasmatischer Substanzen als ein wichtiges Kriterium der vitalen Färbung die Reduktion des Farbstoffes kennen gelernt. Dieses Kriterium fällt höchst wahrscheinlich bei der etwaigen vitalen Kernfärbung fort. Wie nämlich Plato nachgewiesen hat, werden von den vital gefärbten Körnchen nur diejenigen reduziert, welche in der peripheren Zone des Protoplasmas gelegen sind, während die zentralen, in der Nähe des Kernes gelegenen dauernd gefärbt bleiben. Es muss also im Zentrum der Zelle irgend ein oxydierendes Agens vorhanden sein, welches die Reduktion verhindert. Es sprechen viele Gründe dafür, dass dieses Oxydationsorgan der Kern ist. Haben doch Spitzer, Loeb, Brandenburg gezeigt, dass das oxydierende „Ferment" der Zelle an die Anwesenheit der Kernsubstanz gebunden ist. Wenn wir also beurteilen wollen, ob eine Kernfärbung vital ist, ob der Kern, der den Farbstoff aufgenommen hat, schon abgestorben ist, steht uns das Kriterium der Reduktion nicht zu Gebote. Ein gefärbter Kern kann niemals mehr reduziert werden, selbst wenn er vital gefärbt ist.

Von dem Satz: „Ein gefärbter Kern kann niemals mehr reduziert werden" kann ich eine Ausnahme berichten.

Wenn man Froschblut mit 0,6% Kochsalzlösung aufschwemmt, welche etwa 1% Methylenblau enthält und nach einiger Zeit einen Tropfen davon unter das

Deckglas bringt, so ist nirgends eine Spur von Färbung vorhanden. Lässt man das Präparat eine Weile stehen, so gewahrt man merkwürdiger Weise, dass die vorher farblosen Kerne der roten Blutkörperchen blau werden. Nimmt man das Deckglas ab, so dass die äussere Luft hinzutreten kann, so werden die Kerne wieder farblos, um beim längeren Verweilen unter dem Deckglas bei Luftabschluss wieder blau zu werden.

Diese Thatsache, welche ich wiederholt, immer wieder zu grosser Überraschung, beobachtet habe, ist nur so zu erklären, dass das Methylenblau bald als solches, bald in reduziertem Zustande vorhanden ist. Das sonderbare ist aber, dass es gerade bei Luftabschluss im oxydierten, bei Luftzufuhr im reduzierten Zustand vorhanden ist. Die Erklärung liegt in der Gegenwart des Haemoglobins. Bei Beginn des Versuchs ist das Haemoglobin mit Sauerstoff gesättigt. Diesen Sauerstoff hat es zum Teil aus der Luft, zum Teil bei der Reduktion des Methylenblaus erhalten. Daher die Anwesenheit von Leukomethylenblau. Bei Abschluss der Luft beginnt aber das Haemoglobin seinen Sauerstoff abzugeben, denn ob das Haemoglobin Sauerstoff aufnimmt oder abgiebt, das hängt nur von dem Partialdruck des umgebenden Sauerstoffs ab. Dabei tritt die Oxydation des Leukomethylenblau ein.

Es bleibt da nur ein anderes Kriterium übrig. Wenn man z. B. einem Tier Methylenblau subkutan injiziert hat und möglichst frisch die Zellen betrachtet, so finden wir z. B. in der Leberzelle die oben beschriebenen Zentralkörnchen intensiv blau, die zwischen den Körnchen gelegene Substanz hat dagegen keine Färbung angenommen. Diese Färbung ist sicher vital, denn sie wird sehr rasch unter dem Deckglas reduziert. Wenn nun bei längerem Zuwarten auch bei vollem Luftzutritt die Körnchenfärbung vernichtet wird, so ist das ohne jeden Zweifel ein sicheres Zeichen für den beginnenden Zelltod. Gerade in diesem Augenblick tritt aber ganz regelmässig die Kernfärbung ein. Daraus werden wir den Schluss ziehen dürfen, dass es sich nicht um eine vitale Färbung des Kernes handelt. So steht es bei allen Versuchen, den Kern mit Methylenblau, Neutralrot oder Janusgrün zu färben. Immer tritt erst dann Kernfärbung ein, wenn sichere Zeichen vom Tode der Zelle eingetreten sind.

Wir dürfen also als bewiesen annehmen, dass mit diesen drei Farbstoffen eine vitale Kernfärbung nicht möglich ist.

Nun nimmt aber der Kern vieler Protozoën und auch vieler Metazoën-Zellen schon in einem sehr frühen Stadium mit grosser Avidität das Methylgrün an, so dass dieses als vitales Reagens auf Kerne hingestellt wird. Dass das Methylgrün zu den Farbstoffen gehört, die unter Umständen auch vital färben können, erhellt aus der Thatsache, dass man mit Methylgrün (auch mit Malachitgrün) in vielen eigenbeweglichen Bakterien (z. B. Bakt. fluorescens liquefaciens) vital Körnchen färben kann, welche auch Methylenblau annehmen; und zwar sind es Körnchen, die auch durch ganz andere Methoden (Azurreaktion; Neisser'sche Färbung) darstellbar sind. Die Möglichkeit einer vitalen Färbung mit Methylgrün ist demnach nicht von der Hand zu weisen.

Es fragt sich nur, ob die Kernfärbung mit Methylgrün deshalb so leicht zu stande kommt, weil es ein spezifisches Gift für den Kern ist, weil es den Kern rasch abtötet und dann natürlich auch färbt, oder weil das Methylgrün zu dem lebenden Kern Verwandtschaft hat. Die Entscheidung darüber kann uns nur die etwaige Eigenbeweglichkeit von einzelligen Tieren mit grün gefärbtem Kern geben. Und da zeigt es sich, dass niemals irgend eine noch bewegliche, ja im Absterben begriffene Zelle einen grünen Kern hat, sondern dass stets die Kernfärbung erst eine Zeit lang nach dem stattgehabten Zelltod eintritt, ganz anders als die Chlorophyllkörnchen einzelliger Pflanzen, welche stets bei voll erhaltener Beweglichkeit der Zelle die geringsten Spuren Methylgrün an sich ziehen.

Das Methylgrün ist also ein Kerngift, nicht ein spezifisch vital färbender Kernfarbstoff.

Es ist demnach kein Fall von sicherer vitaler Färbung eines Kernes bekannt.

### 3. Anhang. Die Färbung des abgestorbenen Gewebes.

In nahem Zusammenhang mit der vitalen Färbung, wenn auch nicht mit ihr zu verwechseln, steht die Färbung des frisch abgestorbenen Gewebes. Wenn man etwas stärkere Farblösungen einwirken lässt, oder wenn man die Zeit der Beobachtung über den Tod der Zellen ausdehnt, so erhält man oft Färbungen, die durch keine andere Methode zu erhalten sind. Schon Dogiel hat durch diese Methode verschiedene Differenzierungen der Nervenzellen erhalten. Das Methylenblau ist auch sonst von verschiedenen Autoren namentlich für die Darstellung der Bindegewebszellen benutzt worden; Rosin hat im frischen Blutpräparat mit der Methode eigenartige Resultate erhalten. Es ist zu hoffen, dass auch diese Färbemethode noch weiter ausgebaut werden wird.

## VI. Die Färbung des fixierten Objekts.

Der Zweck der Fixation ist es, die Eiweisskörper, aus denen die Gewebe bestehen, ihrer Quellbarkeit und Löslichkeit in Wasser zu berauben, unter Erhaltung der morphologischen Eigenschaften. Dies erreicht man in verschiedener Weise, durch physikalische und durch chemische Agentien. Physikalische Fixationsmethoden sind die Fixation von Abstrichpräparaten nach vorhergegangener Lufttrocknung durch trockene Hitze, die Fixation von Organen in siedendem Wasser. In sehr ähnlicher Weise wie die trockene Hitze wirkt der Alkohol, welcher coagulierend wirkt, ohne selbst in eine chemische Verbindung mit dem Eiweiss einzutreten. Chemisch eingreifender ist die Fixation mit Formaldehyd, welcher die Eiweisskörper in entsprechende Methylenverbindungen verwandelt, ferner die Fixation mit Schwermetallsalzen wie Sublimat, welche Verbindungen des Eiweisses mit den Metallen erzeugt, und die spezifisch eiweissfällenden Säuren, wie Chromsäure.

Die fixierten Objekte verhalten sich den Farbstoffen gegenüber ganz anders als die lebenden. Während die lebenden Kerne gar keine Neigung haben, Farbstoffe aufzunehmen, sind die toten Kerne, noch mehr aber die fixierten Kerne gerade diejenigen Objekte, welche Farbstoffe verschiedenster Natur im allgemeinen am intensivsten aufnehmen.

Die Art der Fixation ist nicht gleichgiltig für den Ausfall der nachfolgenden Färbung. Da viele Fixationen chemische Eingriffe sind, so ist verständlich, dass die dabei verschiedenen resultierenden chemischen Körper auch verschiedene Farbenaffinitäten haben. Jedoch sind die Differenzen nicht gar so erheblich, mit einer Ausnahme: wenn das Fixationsmittel gleichzeitig als Beize fungieren kann, wie die Chromfixierungen. Es ist am natürlichsten, diejenigen Farbaffinitäten als die normalen zu bezeichnen, welche nach der Fixation mit rein physikalischen Mitteln bestehen. Mit den physikalisch fixierten Objekten werden wir uns daher zunächst beschäftigen.

Den zu behandelnden Stoff kann man nach zwei Einteilungsprinzipien ordnen, welchen ich beiden nach einander folgen will, auf die Gefahr hin, hie und da eine kleine Wiederholung eintreten lassen zu müssen; nämlich

1. das Einteilungsprinzip der chemischen Farbstoffklassen.

Die Frage lautet dann:

Wie verhalten sich die im ersten Teil aufgezählten Farbstoffklassen zu den verschiedenen Gewebselementen?

2. das Einteilungsprinzip der Gewebselemente.

Wie verhalten sich die einzelnen Gewebselemente gegenüber den Farbstoffen?

## 1. Das Verhalten der verschiedenen Farbstoffklassen gegenüber dem Gewebe.

Die Farbstoffe lassen sich nach verschiedenen Prinzipien einteilen. Zunächst hatten wir die Einteilung in basische, saure, neutrale, indifferente, Beizen-Farbstoffe kennen gelernt. Dann wurden die Farbstoffe nach ihren chemischen Muttersubstanzen eingeteilt in Nitro-, Azo-, Triphenylmethan- etc. Farbstoffe. Für das Verhalten gegenüber dem Gewebe hat die erstere Einteilung nach den grundlegenden Untersuchungen von Ehrlich einen viel grösseren Wert als die zweite, wir halten uns daher an diese.

### a) Die einfachen (nicht vermischten) Farbstoffe.

#### 1. Die sauren Farbstoffe.

Saure Eigenschaften kann ein Farbstoff besitzen durch die Anwesenheit

a) der *OH*-Gruppe: Farbphenole,
b) der *CO OH*-Gruppe: Carbonsäuren,
c) $SO_3\ H$ — Sulfosäuren,
d) $NO_2$ — Nitrofarbstoffe.

Am stärksten sauer sind die $SO_3\ H$- und $NO_2$-Farbstoffe, weniger die *CO OH*-Körper, und noch weniger die *OH*-Farbstoffe. Gleichzeitige Anwesenheit von *OH* und *CO OH* erzeugt ziemlich stark saure Farbstoffe (Eosin). $NO_2$ ist stets gleichzeitig mit *OH* vorhanden, nur nicht in Aurantia (Hexanitrodiphenylamin).

Die sauren Farbstoffe kommen z. T. als freie Farbsäuren (Pikrinsäure), z. T. als Alkalisalze, Orange G, als neutrales *Na*-Salz, Eosin auch als *K*-Salz, Aurantia als $NH_4$-Salz zur Verwendung. Gewisse Farbstoffe, welche mehrere $SO_3\ H$-Gruppen besitzen (Säurefuchsin), werden in Form der sauren Salze benutzt, bei denen eine $SO_3\ H$-Gruppe an Alkali gebunden, mindestens eine aber frei ist.

Im allgemeinen kann man sagen, dass die sauren Farbstoffe am diffusesten färben, dass sie die geringsten spezifischen Affinitäten zu bestimmten Gewebselementen haben.

Nach einem anderen, von Ehrlich aufgestellten Prinzip lassen sich die sauren Farbstoffe in zwei Gruppen einteilen:

1. die leicht diffundierenden, aber auch leicht wieder extrahierbaren Farbstoffe,

a) die Sulfosäuren des Rosanilins (Säurefuchsin) und Malachitgrüns,

b) die Sulfosäuren der Azofarbstoffe (Orange G, Bordeaux und viele andere);

2. die schwer diffundierenden, aber auch schwer extrahierbaren, physikalisch echten Farbstoffe,

a) die Mono- und Disulfosäure des Anilinblau,

b) die dunkelen, zur Klasse der Induline gehörenden Farbsäuren (Indulin, Nigrosin).

In keine dieser beiden Klassen lassen sich eine Reihe von sauren Farbstoffen einreihen, welche allen anderen gegenüberstehen. Ehrlich hat sie als primäre Farbsäuren bezeichnet, womit er ausdrücken will, dass sie nicht durch Sulfonierung, Carboxylierung etc. aus einem primär basischen Farbstoff hervorgegangen gedacht werden können, sondern, dass sie an sich von vorne herein einen sauren Charakter zeigen. Sie sind identisch mit den von uns als Beizenfarbstoffen bezeichneten. Sie haben einen nur schwach sauren Charakter und sind als substantive Farbstoffe unbrauchbar.

Ehrlich hat die sauren Farbstoffe für die Nutzanwendung in der Histologie noch nach einem anderen Prinzip eingeteilt, nach der Intensität ihres Färbevermögens. Aus wässeriger Lösung färben alle sauren Farbstoffe leichter als aus alkoholischer oder glyzeriniger Lösung, weil sie zum Wasser die geringste Lösungsaffinität besitzen. Alkohol und noch mehr Glyzerin sind Extraktionsmittel für die Farbstoffe, weil sie bessere Lösungsmittel für sie sind. Wenn man also die Intensität des Färbevermögens eines Farbstoffes gegen ein Gewebselement prüfen will, so hat man zuerst zu versuchen, ob die Färbung aus wässeriger Lösung vor sich geht; thut sie dies, so untersucht man, ob sie auch aus alkoholischer, dann aus glyzeriniger Lösung vor sich geht. Geschieht die Färbung aus wässeriger Lösung, wird aber schon durch Wasser wieder extrahiert (Orange G gegen Protoplasma), so ist sie wasserunecht. Wird sie nicht durch Wasser, aber durch Alkohol extrahiert, so ist sie wasserecht und alkoholunecht. Der höchste Grad der Färbekraft drückt sich in dieser Skala in der Glyzerin-Echtheit aus.

Denselben Effekt wie z. B. Färbung aus glyzeriniger Lösung hat eine intensive, ad maximum fortgesetzte Färbung aus wässeriger Lösung mit nachfolgender maximaler Extraktion mit Glyzerin.

Eine Färbung aus wässeriger Lösung ohne nachfolgende Extraktion nennt man eine progressive Färbung, eine Färbung mit

nachfolgender Extraktion zum Zweck der teilweisen Entfärbung eine regressive Färbung.

Die Extraktion kann ausser durch Anwendung eines nur lösenden Mittels wie Alkohol oder Glyzerin auch durch Anwendung eines chemisch wirkenden Mittels erfolgen, wie Säure oder Alkali. Ich möchte nun auch hierbei vermeiden, in eine Diskussion darüber einzutreten, was bei diesen Prozessen „chemisch" und „physikalisch" ist und will daher diese Ausdrücke lieber vermeiden. In derselben Weise wie ich von Injunktion und Insorption bei dem Färbeprozess sprach, möchte ich beim Entfärbungsprozess die Begriffe der Exjunktion und Exsorption einführen. Die Exjunktion besteht darin, dass das Extraktionsmittel die salzartige Verbindung zwischen dem Farbstoff und dem Gewebe trennt und sich selbst mit der Farbsäure (bezw. Farbbase) zu einem Salz vereinigt. Die Exsorption dagegen besteht darin, dass der Farbstoff, welcher insorptiv in dem Gewebe gebunden war, als Ganzes, ohne vorhergegangene Dissoziation extrahiert wird, ohne mit dem Extraktionsmittel eine salzartige Bindung einzugehen.

Schon aus dem Gesagten ergiebt sich, dass selbst die sauren Farbstoffe, die doch die am wenigsten ausgeprägten spezifischen Affinitäten haben, doch nicht alle Gewebselemente gleichmässig färben, und dass andererseits die verschiedenen Klassen der sauren Farbstoffe sich gegen ein und dasselbe Gewebselement verschieden verhalten können.

In färberischer Beziehung am bedeutsamsten ist die Einteilung in die leicht und schwer diffundierenden.

Die leicht diffundierenden sauren Farbstoffe sind fast alle linksspektral, gelb bis rot. Die gebräuchlichsten sind Pikrinsäure, Aurantia, Orange G, Bordeaux R, Congorot, Eosin und seine Verwandten (Erythrosin etc.), Säurefuchsin. Diese Farbstoffe färben wiederum unter den sauren Farbstoffen am diffusesten. Zwei Gewebselemente giebt es, zu denen sie eine auffällig geringe Verwandtschaft zeigen, die basophilen Granula und die Zellkerne. Die basophilen Granula färben sich überhaupt nicht mit ihnen, die Zellkerne im Trockenpräparat nicht, in geringem Grade manchmal auf Schnittpräparaten, wenn kein basischer Farbstoff gleichzeitig zur Anwendung kommt.

Die schwer diffundierenden sauren Farbstoffe sind meist rechtsspektrale, blaue bis violette Farbstoffe. Bei den meisten und wichtigsten (Induline und Nigrosine) ist die Constitution noch nicht mit voller Sicherheit aufgeklärt, jedoch sind im ersten Teil des Buches einige Basen (p. 50) angegeben, durch deren Sulfonierung man sie sich entstanden denken kann. Hierhin gehören auch die in ihrer Constitution bekannten „wasserlöslichen Anilinblau"-Marken, die ver-

schiedenen Sulfosäuren des Mono- bis Triphenylrosanilin. Die Diffusibilität dieser Farbstoffe nimmt nach Ehrlich mit der Anzahl der Sulfosäuregruppen zu, gleichzeitig auch die Unechtheit. Es besteht hier die merkwürdige Thatsache, dass, entgegen der allgemeinen Regel, die Farbstoffe mit weniger salzbildenden Gruppen die echteren, farbkräftigeren sind. Ehrlich erklärt dies so, dass die sehr stark elektronegative $SO_3H$-Gruppe allein, wenn sie an das Molekül herantritt, den sauren Charakter so stark beeinflusst, dass eine zweite $SO_3H$-Gruppe ihn nicht mehr vermehren kann und daher nur die Diffusibilität, nicht aber die Acidität erhöht.

Sie unterscheiden sich von den Farbstoffen der ersten Klasse dadurch, dass sie die Kerne etwas besser färben. Die Kernfärbung geschieht langsam, aber selbst glyzerinecht. In dem bekannten Ehrlich'schen Gemisch der drei sauren Farben Indulin, Eosin und Aurantia färben sich die Kerne mit Indulin. Die Mastzellenkörner nehmen aber auch diese Farbstoffe nicht an.

Bei der Färbung mit den sauren Farbstoffen spielt, in der Industrie noch mehr als in der Histologie, der Zusatz von Säuren oder Alkalien zum Färbebade eine wichtige Rolle. Zahlreiche Färbungen gehen aus saurer Lösung schneller und intensiver von statten als aus alkalischer. Mitunter hat das seine Ursache darin, dass der Farbstoff in alkalischer Lösung ungefärbt und erst in saurer Lösung die Farbe erhält, wie beim Säurefuchsin. Meist — auch beim Säurefuchsin — hat man die Wirkung des Säurezusatzes darin zu suchen, dass sie die Dissoziation des Farbsalzes erhöht, etwa in derselben Weise, wie Ferrocyanwasserstoffsäure sich nur in saurer, nicht in neutraler oder alkalischer Lösung mit Eiweiss verbindet. Man wird daher in den Fällen, bei denen zur Erzielung einer guten Färbung Säurezusatz notwendig ist, vermuten können, dass es sich um eine injunktive Färbung handelt, welche also nicht durch Alkohol allein extrahiert werden kann.

Zu dieser Klasse von Farbstoffen gehören von den in der Histologie gebräuchlichen S-Fuchsin, Orange G, Bordeaux R, Eosin etc. Aber es ist bekannt, dass man mit all diesen Farbstoffen auch aus neutraler Lösung, ja, wenn die Farbstoffe an sich es vertragen (Eosin), auch aus alkalischer Lösung färben kann.

Einen Gegensatz zu diesen Farbstoffen bildet eine Klasse von Farbstoffen, welche sich vom Benzidin und verwandten Basen ableiten und in der Technik dadurch ausgezeichnet sind, dass sie ungebeizte Baumwolle färben. In der Histologie sind diese Farbstoffe, wohl mit Unrecht, ziemlich wenig angewandt worden, am meisten noch das Congorot.

Die Baumwolle wird mit diesen Farbstoffen aus neutraler oder sogar leicht mit Seife alkalisierter Lösung gefärbt. Aus saurer Lösung

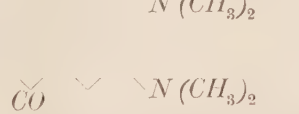
färben die Farbstoffe die Baumwolle nicht. Man hat schon länger erkannt, dass diese Farbstoffe als Ganzes, als neutrales Farbsalz, ohne sich vorher zu dissociieren, in die Baumwolle hineindiffundieren, und sie deshalb mit dem nicht sehr glücklich gewählten Namen der „Salzfarbstoffe" (auch wohl „neutralen" Farbstoffe) belegt. Jedenfalls ist die Färbung der Baumwolle mit diesem Farbstoffe eins der besten Beispiele für die insorptive Färbung.

### 2. Die basischen Farbstoffe.

Zunächst giebt es eine kleine Gruppe von basischen Farbstoffen, deren Basicität so gering ausgesprochen ist, dass sie nur mit stärkeren Säuren (*HCl*) beständige Salze bilden, welche aber durch blosse Extraktionsmittel, wie Chloroform, fette Öle etc. gespalten werden, indem aus einer Lösung der Farbsalze die freie Farbbase allein in das Chloroform hineindiffundiert. Die Lösungsaffinität der Farbbase zum Chloroform ist grösser als die chemische Affinität zur Salzsäure. Eine noch viel geringere Avidität haben diese Farbstoffe zur Essigsäure, indem ihre essigsauren Salze selbst bei Gegenwart eines bedeutenden Überschusses an freier Essigsäure durch Chloroform gespalten werden.

Hierhin gehören z. B. die infolge der Anwesenheit nur einer Amidogruppe sehr schwach basischen Farbstoffe Dimethylamidoazobenzol (p. 32) und Indophenol von der Constitution

ferner das Tetramethyldiamidoanthrachinon (Herxheimer),



dessen zwei Amidogruppen durch die beiden stark säurebildenden *CO*-Gruppen stark beeinträchtigt werden.

Die Farbstoffe färben in Form der freien Basen, welche in Alkohol löslich sind, das Fett. Auch aus den Salzen des Dimethylamidoazobenzol vermag das Fett aus wässeriger Lösung die freie Base abzuspalten.

Abgesehen davon aber zeigen die basischen Farbstoffe trotz ihrer Mannigfaltigkeit in Bezug auf die chemischen Muttersubstanzen ein recht gleichartiges Verhalten gegenüber dem Gewebe. Sie werden stets als Farbsalze, niemals als freie Farbbasen verwendet. Sie haben

eine ausgesprochene Affinität zu den Kernen, so dass aus sehr verdünnten wässerigen Lösungen, sowie aus alkoholischen Lösungen fast allein die Kerne gefärbt werden. Gegenüber den protoplasmatischen Substanzen verhalten sie sich etwas verschieden, indem die einen sie ebenfalls ziemlich stark anfärben, besonders aus konzentrierteren wässerigen Lösungen (Fuchsin, Methylviolett), andere weniger (Methylenblau, noch weniger Thionin). Bei der exsorptiv-regressiven Färbung giebt sich die Affinität zu den Kernen noch stärker zu erkennen. Die Kerne halten bei der Exsorption mit Alkohol den Farbstoff immer am längsten, ja die meisten Kernfärbungen mit basischen Farbstoffen sind durch blosse Exsorption überhaupt nicht völlig zu entfärben.

Eine noch grössere Verwandtschaft als zu den Kernen haben die basischen Farbstoffe zu den Mastzellengranula und dem Schleim. Die Mastzellenfärbung ist nicht zu exsorbieren, wohl aber die Schleimfärbung.

Einige Farbstoffe giebt es, deren Affinität zu den Kernen ganz besonders gross ist, vor allem das Methylgrün, welches geradezu als ein spezifischer Kernfarbstoff betrachtet zu werden pflegt. Man hüte sich aber, den Glauben an diese Spezifizität zu weit zu treiben. Eine noch grössere Vorliebe als zum Chromatin hat das Methylgrün zu den chlorophyllhaltigen Elementen der Pflanzenzellen.

### 3. Die Metachromasie.

Eine grosse Anzahl von basischen Farbstoffen hat die Eigentümlichkeit, verschiedene Gewebselemente mit verschiedener Nuance zu färben. Als Beispiele seien vorläufig angeführt:

Methylviolett färbt Kerne blauviolett, amyloide Substanz rot. Thionin färbt Kerne blau, Schleim und Mastzellengranula rot. Safranin färbt Kerne rot, Schleim gelb. Jodgrün soll Kerne grün, amyloide Substanz rot färben.

Diese Eigenschaft kann auf zwei Ursachen beruhen. Entweder ist der scheinbar einheitliche Farbstoff ein Gemisch zweier Farbstoffe, sodass die Betrachtung dieser Färbung in das Kapitel gehört, welches die Einwirkungen eines Gemisches basischer Farbstoffe auf die Gewebe behandelt. Hierhin gehört die Rotfärbung der amyloiden Substanz mit Jodgrün, welche auf dem Gehalt des Farbstoffes an Methylviolett beruht.

Oder es ist eine Eigenschaft des chemisch reinen Farbstoffes an sich. Das nennt man Metachromasie.

Bezüglich der Festlegung der Nomenklatur diene folgendes Beispiel.

Methylviolett ist ein zur Metachromasie neigender Farbstoff. Seine Farbe schwankt von blau über violett bis rot. Es färbt orthochromatisch blau die Kerne, metachromatisch rot die amyloide Substanz aus wässeriger Lösung. Aus alkoholischer Lösung färbt es auch die amyloide Substanz orthochromatisch.

Das älteste Beispiel eines metachromatischen (wenn auch nicht basischen) Farbstoffes ist das Jod, welches Zellkerne, Bindegewebe und dergl. hellgelb bis gelbbraun, amyloide Substanz und Glykogen mahagonibraun, Stärke blau, Chloroform violett färbt. Von den organischen Farbstoffen ist geschichtlich der älteste das soeben erwähnte Methylviolett. Es zeigte sich bald, dass auch andere basische violette Farbstoffe der Triphenylmethanreihe (Dahlia etc.) eine ähnliche Metachromasie besitzen.

Über das Wesen der Metachromasie ist bisher noch so gut wie nichts bekannt gewesen. Pappenheim sieht in der Metachromasie nur einen Beweis dafür, dass bei der Färbung chemische Prozesse vor sich gehen, weil er nur durch solche den Farbenumschlag erklärt wissen möchte. Ich möchte nun versuchen, das Wesen der Metachromasie durch die folgenden Betrachtungen dem Verständnis näher zu führen.

Zunächst muss man es als ein durchgehendes Gesetz aufstellen, dass die metachromatische Nuance eines basischen Farbstoffes durchweg die Nuance seiner freien Base ist. Die Base des Thionin, des Methylenazur etc. ist rot bis rotbraun und auch die Base des Methylviolett ist rot. Wenn man Methylviolett mit Alkalien versetzt, so fällt zunächst ein roter Niederschlag aus, welcher offenbar die freie Base des Methylviolett darstellt. Diese verwandelt sich allerdings sehr rasch in die entsprechende farblose Carbinolbase.

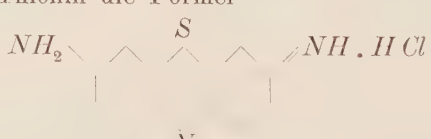
Man könnte nun zunächst versucht sein, die Metachromasie so zu deuten, als reagierten die chromotropen Substanzen, wie z. B. die Mastzellkörnchen, stark alkalisch und verhielten sich daher dem Farbstoff gegenüber wie etwa die Natronlauge. Wäre dies der Fall, so müsste man die Rotfärbung der Mastzellkörnchen aus Thionin durch nachträgliche Behandlung mit Salzsäure wieder blau machen können, da man ja dann der Thioninbase Gelegenheit gäbe, ein Salz zu bilden. Dies ist aber nicht der Fall, also kann der rote Farbstoff, welchen die Mastzellkörnchen aus dem blauen Thionin aufnehmen, nicht die freie Thioninbase sein. Das beweist auch noch eine andere Thatsache. Wenn man z. B. Schleim mit Thionin in wässeriger Lösung rot gefärbt hat und setzt ihn der Einwirkung des Alkohols aus, so geht die Metachromasie verloren und der Schleim nimmt eine blaue Farbe an; bringt man den Schleim wieder in Wasser zurück, so verwandelt er seine Farbe allmählich wieder in rot. Dieses Spiel kann

man beliebig oft wiederholen. Es beweist, dass jedenfalls die Umwandlung der roten Modifikation des Thionin in die blaue und umgekehrt ein mit spielender Leichtigkeit ohne tiefere Veränderungen vor sich gehender Prozess ist. Es liegt da also ausserordentlich nahe, anzunehmen, dass die rote Modifikation und die blaue Modifikation des Thionin tautomere Verbindungen sind, also Verbindungen, welche aus einander mit Leichtigkeit hervorgehen können, indem ein Atom oder eine Atomengruppe von einer Stelle des Moleküls nach einer andern wandert, wie wir dieses in der speziellen Farbstoffchemie schon sehr häufig beobachtet haben (vgl. die Azofarbstoffe).

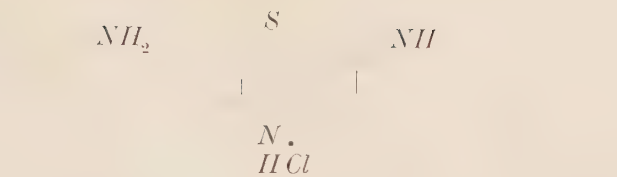
Nun hatten wir als empirische Regel aufgestellt, dass die metachromatische Nuance stets die Farbe der freien Base ist, also offenbar muss diejenige Amidogruppe, welche in dem gewöhnlichen blauen Thionin an Salzsäure gebunden ist, bei dem roten metachromatischen Thionin frei sein. Da die Säure nicht verschwunden sein kann, wird sie sich an einer anderen Stelle des Moleküls befinden und da bleibt, wenn man das Molekül des Thionin betrachtet, nichts weiter übrig, als das Stickstoffatom, welches dem Schwefel gegenübersteht und die beiden Benzolringe verkettet. Wir können dieses Stickstoffatom als das Binde-*N* bezeichnen, die beiden seitlichen, den Amidogruppen angehörenden *N*-Atome als die Seiten-*N*. Alle nach dem Typus des Indamin constituierten Farbstoffe haben ein solches Binde-*N* und zwei Seiten-*N*, z. B. Indamin, Thionin, Oxonin u. a.

Es hat sich nun durch Untersuchungen besonders von Nietzki herausgestellt, dass diejenigen indaminartig constituierten Farbstoffe blau sind, bei denen die Salzbildung an einer der von mir oben so benannten Seiten-*N* stattfindet, während die freien Basen dieser Körper alle rot sind. Dagegen sind diejenigen indaminartigen Farbstoffe, bei denen die Salzbildung an dem Binde-*N* stattfindet, in Form ihrer Salze rot. Nietzki hat z. B. nachgewiesen, dass beim Safranin und auch dem analog beim Neutralrot die Salzbildung an dem Binde-*N* stattfindet. Zwingt man die beiden letzten Farbstoffe durch einen Ueberschuss von Säure, auch an einem ihrer Seiten-*N* ein Salz zu bilden, mit anderen Worten, bildet man ein zweisäuriges Salz dieser Farbstoffe, so tritt sofort die blaue Farbe hervor.

Alle diese Thatsachen sprechen allein dafür, das wir der blauen Modifikation des Thionin die Formel




und der roten Modifikation des Thionin die Formel



zuschreiben müssen. Warum nun das Thionin, wenn es an Zellkerne gebunden ist, immer nach der Formel 1, wenn es an Mastzellgranula gebunden ist, immer nach der Formel 2 constituiert ist, das können wir ebenso wenig beantworten, als z. B., warum Jod in Alkohol braun, in Chloroform violett erscheint. Im übrigen ist mit dieser Theorie garnichts darüber ausgesagt, ob eine metachromatische Färbung insorptiv oder injunktiv sei. In derselben Weise, wie die Salzsäure sich an das Binde-*N* des Thionin bindet, kann auch irgend eine Gewebssäure, die z. B. in den Mastzellgranula enthalten sei, dies thun.

Mit der soeben aufgestellten Theorie vom Wesen der Metachromasie steht eine grosse Reihe von empirisch beobachteten Thatsachen in bestem Einklang, so z. B. besteht die sonst unerklärliche Erscheinung, dass in der Gruppe der indaminartigen Farbstoffe nur diejenigen Farbstoffe befähigt sind, metachromatisch zu färben, welche mindestens eine freie Amidogruppe enthalten, dagegen nicht diejenigen, deren sämtliche Amidogruppen vollkommen substituiert sind. Von letzteren giebt es drei Repräsentanten: Bindschedler's Grün aus der Klasse der Indamine, Methylenblau aus der Klasse der Thiazine, Capriblau aus der Klasse der Oxazine. Alle drei, und zwar nur sie, sind allein von allen Farbstoffen der Klasse nicht im stande, metachromatisch zu färben. Das liegt einfach daran, dass die *HCl* zwar beim Thionin wandern kann, nicht aber bei einem dieser drei Farbstoffe, denn in ihnen ist nicht *HCl*, sondern $CH_3Cl$ enthalten. Es sind alles Ammoniumbasen.

Zum Schlusse muss ich noch zweier Thatsachen gedenken, welche dieser Theorie einige Schwierigkeiten in den Weg zu legen scheinen. Das ist erstens die Thatsache, dass das Methylenazur, und zweitens, dass das Methylviolett metachromatisch färbt, beide sind aber nach der ihnen zugeschriebenen Formel Ammoniumbasen und sollten daher nach der Theorie nicht im stande sein, metachromatisch zu färben.

Was nun zunächst das Methylenazur anbetrifft, so möchte ich nicht verhehlen, dass die diesem Farbstoff von Bernthsen zugeschriebene Formel wenig plausibel ist. Dass der Farbstoff keine Ammoniumbase ist, sieht man schon daraus, dass es so leicht gelingt, die freie Farbbase unter gleichzeitigem Farbenumschlag nach rot, durch blossen Zusatz von Natronlauge in Freiheit zu setzen und beim Methylviolett ist es nicht viel anders. Zwar scheint die Formel des Methylviolett sicher festzustehen, doch ist auch sie nicht im stande,

zu erklären, wie es möglich ist, dass aus dem Methylviolett mit derselben Leichtigkeit wie bei dem unsubstituierten Farbstoff Fuchsin die Base durch Natronlauge und in der Wärme sogar durch Ammoniak in Freiheit gesetzt wird. Wenn ich somit in einem früheren Kapitel die Formel des Methylviolett nach der heute üblichen Anschauung wiedergegeben habe, so möchte ich an dieser Stelle darauf hinweisen, dass doch noch eine Unklarheit für die wahre Constitution des Farbstoffes bestehen bleiben muss.

Nach diesen theoretischen Bemerkungen über Metachromasie möchte ich noch einige faktische Angaben machen.

Die Resistenz der Metachromasie gegen exsorbierende und exjungierende Mittel ist verschieden.

Es giebt zunächst metachromatische Färbungen, welche nur in wässeriger Lösung zu stande kommen und in jeder anderen Flüssigkeit als Wasser vernichtet werden. So färbt z. B. Methylenazur in wässeriger Lösung Kerne blau, Bindegewebsfibrillen violett. Ein Farbstoff, den ich durch gemeinsame Oxydation von Thionin und Resorcin erhielt,[1]) färbt in wässeriger Lösung oder in alkoholischer Lösung, wenn die Schnitte nachträglich in Wasser gebracht werden, Kerne blau, Markscheiden rot. Aber diese Färbung ist nur in destilliertem Wasser einige Zeit haltbar. Zusatz von irgend welchem Salz, von Säuren, von Alkohol etc. bewirkt, dass die Bindegewebsfasern bezw. die Markscheiden fast augenblicklich die orthochromatische Farbe annehmen und dann ganz allmählich entfärbt werden.

Etwas resistenter ist die Rotfärbung der amyloiden Substanz durch Methylviolett. Zwar wird diese durch Alkohol augenblicklich in die orthochromatische Färbung verwandelt, doch bleibt sie erhalten in Glyzerin, gesättigter Lösung von Kali aceticum, Laevulosesirup. Säuren, Glyzerin, Säuren extrahieren die Farbe allmählich, ohne sie vorher orthochromatisch zu machen. Das Glyzerin selbst färbt sich dabei aber orthochromatisch. Laevulose ist ohne jeglichen Einfluss. Amyloidpräparate halten sich in Laevulose jahrelang ohne jede Einbusse an Farbschönheit. Xylol hat keinen Einfluss auf die Metachromasie. Wenn man Schnitte aus dem Wasser trocknen lässt, um den Alkohol zu vermeiden, so kann man ihn ohne Veränderung der Farbe in Xylol und Kanadabalsam bringen. Natürlich erzeugt die Trocknung beträchtliche Schrumpfungen, welche den Schnitt histologisch unbrauchbar machen.

Es giebt nicht ein einziges Übergangsmedium zwischen Wasser und Xylol, das die Metachromasie der amyloiden Substanz nicht zerstörte.

[1]) Vgl. das Kapitel „Färbung der elastischen Fasern“.

Ferner: Thionin färbt Schleim metachromatisch rot, und zwar am reinsten frisch oder nach Sublimatfixation, gut auch nach Formalin- oder Alkoholfixation. Aber nicht alle Schleimsorten zeigen denselben Grad der Metachromasie. Mitunter fällt die Färbung nur violett, mit allen Übergängen, aus. Zu lange Fixierung der Organe in Alkohol vermindert die chromotrope Eigenschaft des Schleims (wie auch der amyloiden Substanz). Aber auch sonst, unabhängig vom Aufenthalt in Alkohol, variiert die Metachromasie des Schleims aus unbekannten Ursachen, je nach dem Organ oder der Tierspezies.

Die Schleimfärbung hält sich in Alkohol bei sehr kurz bemessener Einwirkung metachromatisch, so dass es gelingt, metachromatisch gefärbten Schleim zu entwässern und in Kanadabalsam zu bringen. Allerdings leidet die Metachromasie dabei etwas, und es tritt ein Mischton zwischen der orthochromatischen und der metachromatischen Nuance auf. Der Grad, in welchem die Schleimfärbung durch den Alkohol verändert wird, variiert wiederum unberechenbar. Von manchem Stück gelingt es durchaus nicht, die Metachromasie durch den Alkohol hindurch zu retten, bei anderen geht es ganz leicht.

Die echteste Metachromasie haben die Mastzellen. Auch die Fähigkeit der Mastzellen, sich metachromatisch zu färben, kann durch zu langen Aufenthalt in Alkohol stark beeinträchtigt werden. Wo aber die Färbung eingetreten ist, wird sie in der Regel weder durch Säuren, noch Alkohol, noch Glyzerin etc. beeinflusst. Manchmal leidet die Metachromasie ein wenig durch Alkohol.

### 4. Die neutralen Farbstoffe.

Wir fassen den Begriff des neutralen Farbstoffs ganz scharf als das Salz aus einer Farbbase und einer Farbsäure. Ebenso, wie wir soeben die Einwirkung der isolierten, sauren und basischen Farbstoffe auf die Gewebe besprochen haben, so muss es auch zunächst unsere Aufgabe sein, die chemisch reinen neutralen Farbstoffe, ohne gleichzeitige Anwesenheit eines überschüssigen sauren oder basischen Farbstoffs zu studieren. Denn es wird sich späterhin zeigen, dass die in der Praxis gebräuchlichen sog. neutralen Farbstoffgemische weit davon entfernt sind, chemisch reine neutrale Farbstoffe in Lösung darzustellen und dementsprechend auch ganz andere Eigenschaften haben.

Ehrlich hatte immer nur mit Lösungen der neutralen Farbstoffe in einem Überschuss des sauren Farbstoffs gearbeitet. Rosin hat einige neutrale Farbstoffe isoliert und sie auf ihre Eigenschaft geprüft. Um sie aber in Lösung zu bringen, wandte er wiederum einen Überschuss des basischen Farbstoffes (Methylenblau) an und hatte daher ebenso wenig die reine Lösung eines neutralen Farbstoffes vor sich, wie Ehrlich.

Ich habe die beiden neutralen Farbstoffe pikrinsaures Methylenblau und eosinsaures Methylenblau in reinem Zustande geprüft und will die Resultate kurz auseinandersetzen.

Dargestellt wurden die Farbstoffe, indem eine starke wässerige Lösung von Methylenblau medicinale (Hoechst) mit der passenden Menge einer gesättigten wässerigen Lösung von Pikrinsäure oder Eosin versetzt wurde. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert, wiederholt mit warmem und kaltem Wasser unter grossen Verlusten gewaschen, bei niederer Temperatur im Exsiccator langsam getrocknet.

Das pikrinsaure Methylenblau ist in Wasser zwar schwer, aber für einen Färbeversuch genügend löslich. Das eosinsaure Methylenblau ist sogar noch etwas besser löslich.

Ein ganz besonderer Wert muss auf die absolute Reinheit des Wassers gelegt werden, in welchem die neutralen Farbstoffe gelöst werden. Das Wasser muss völlig frei von Alkali sein. Wasser, das einige Zeit in Glasgefässen aufbewahrt worden ist, ist immer alkalisch. Als Indikator kann Neutralrot, Haematoxylin oder Alizarinrot benutzt werden.

Ich benutzte frisches, soeben destilliertes Wasser, das in mit Paraffin ausgegossenen Glasgefässen aufgefangen und aufbewahrt wurde. Ich habe es auch vermieden, das Wasser zur schnelleren Lösung der Farbstoffe zu erwärmen, weil die Abspaltung von Alkali aus der Glaswand beim Erwärmen ganz bedeutend beschleunigt wird.

Die Farbe der neutralen Farbstoffe aus Methylenblau unterscheidet sich nur wenig vom reinen Methylenblau. Das pikrinsaure Methylenblau ist eine Spur grünlicher, das eosinsaure Methylenblau ist um eine nur durch Vergleichung wahrzunehmende Nuance violetter als reines Methylenblau. (Spectroskopisch lassen sich die Farbstoffe deutlich von einander unterscheiden.)

Färbt man nun einen Schnitt in der wässerigen Lösung einer dieser neutralen Farbstoffe längere Zeit, so tritt eine ganz gleichmässige Färbung des ganzen Schnittes ein, welche die Nuance des neutralen Farbstoffes hat, also beim pikrinsaurem Methylenblau grünlicher, beim eosinsaurem Methylenblau violetter als beim reinen Methylenblau ist. Bei ganz langer Einwirkung differenziert sich der Kern vom Protoplasma, indem das Protoplasma deutlicher grün, bezw. violett, niemals aber gelb oder rot wird. Der Kern wird reiner blau.

Nur ev. vorhandene rote Blutkörperchen färben sich von vorne herein rein gelb bezw. rot.

Die Schlüsse, die man daraus ziehen kann, sind offenkundig. Zunächst tritt eine Insorption des gesamten, nicht zerlegten neutralen Farbstoffes ein. Allmählich tritt eine geringgradige Zerlegung des

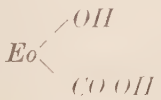
neutralen Farbstoffes hervor, indem das Protoplasma sich, ausser mit dem neutralen Farbstoff, noch mit etwas von dem isolierten sauren Farbstoff färbt, der Kern mit dem isolierten basischen Farbstoff.

Die roten Blutkörperchen nehmen dagegen die insorptive Färbung nicht an, sondern färben sich von vorne herein nur injunktiv mit der sauren Komponente.

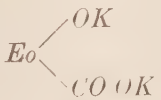
Ganz anders verhalten sich die neutralen Farbstoffe, wenn sie unter Zusatz von Säuren oder im Überschuss eines ihrer Komponenten gelöst zur Anwendung gelangen. Aber hierbei haben wir es nicht mehr mit reinen neutralen Farbstoffen zu thun, sondern mit einem sehr komplizierten Umlagerungsprodukt derselben. Deshalb sei noch einmal betont, dass „neutraler Farbstoff" und „Mischung eines sauren und basischen Farbstoffs", selbst in dem zur Bildung des neutralen Farbstoffes berechneten Mengenverhältnis, durchaus nicht indentisch sind. Diese Farbgemische werden wir später bei der Besprechung der Farbstoffkombinationen abhandeln.

Zwischen Farbbasen und Farbsäuren, welche mehr als je eine salzbildende Gruppe besitzen, ist die Bildung verschiedenartiger neutraler Farbstoffe denkbar. Dabei kommen nicht so sehr die mehrsäurigen basischen Farbstoffe in Betracht, deren Mehrsäurigkeit sich stets nur gegen sehr starke Säuren und bei Gegenwart eines grossen Überschusses derselben äussert, als die mehrbasigen sauren Farbstoffe.

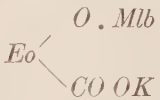
So kann zwar nur ein pikrinsaures Methylenblau gedacht werden, weil die Pikrinsäure nur eine *OH*-Gruppe besitzt, aber zwei eosinsaure Methylenblau. Eosin bildet zwei Reihen Salze, an einer *OH*- und an einer *CO OH*-Gruppe. Die Eosinsäure kann daher in abgekürzter Weise geschrieben werden:

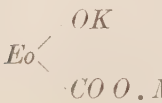



Das gewöhnliche Eosin ist




Neutrale Farbstoffe mit Methylenblau (*Mlb*) sind 3 denkbar:

1) 


2) 

3) $Eo \begin{matrix} /O\,Mlb \\ \\ \cdot CO\,O\,Mlb \end{matrix}$

Die grosse Ähnlichkeit des pikrinsauren und eosinsauren Methylenblau spricht dafür, dass nur ein Molekül Methylenblau in dem eosinsauren Methylenblau enthalten ist. Das würde der Formel 1) oder 2) entsprechen. Analysiert ist das Salz noch nicht. Eine Lösung von eosinsaurem Methylenblau in überschüssigem Methylenblau mag vielleicht das Salz 3) enthalten.

In dem Ehrlich'schen Triacid sind die beiden neutralen Farbstoffe Orange *G*-Methylgrün und Säurefuchsin-Methylgrün enthalten. Ein Versuch, diese Farbkörper rein zu erhalten, scheitert an der doch recht bedeutenden Wasserlöslichkeit derselben, so dass sie von dem Rest ihrer Komponenten durch Auswaschen kaum zu befreien sind.

## 5. Die Beizenfarbstoffe.

Entsprechend ihrer Eigenschaft als saure Farbstoffe haben die Beizenfarbstoffe, wenn man sie ohne Beize in Form der Alkalisalze anwendet, die Eigenschaften der diffus färbenden, sauren Farbstoffe. Diese Färbungen sind aber sehr unecht.

In Verbindung mit Beizen nähert sich ihre Farbaffinität der der basischen Farbstoffe, indem sie, teils schon bei progressiver, teils bei regressiver Färbung, Kernfarbstoffe sind. Aber sie unterscheiden sich doch auch von den basischen Farbstoffen, indem sie Mastzellengranula und Schleim ungefärbt lassen. In der Histologie kommen eigentlich nur zwei Beizenfarbstoffe zur Verwendung, diese aber mit Recht in ungemeiner und vielseitiger Ausdehnung, das Carmin und das Haematoxylin mit seinen Oxydationsstufen.

Die Beizen kommen in zweierlei Weise zur Anwendung, entweder gleichzeitig mit dem Farbstoff, oder vorher. Die vorherige Beizung der Gewebe pflegt man nur bei der Haematoxylinfärbung vorzunehmen. Als Beizen gebraucht man: Chromsäure und ihre Salze, Kupfersalze, Eisenoxydsalze, Phosphorwolframsäure etc. Wie man sieht, sind die Salze von basischen Metalloxyden (Kupfersalze) gleichzeitig mit höher oxydierten, sauer reagierenden Metallverbindungen (Chromsäure) zusammen genannt. Wie ist es möglich, dass zwei chemisch so grundverschiedene Stoffe wie ein Salz des Kupferoxydhydrats und die Chromsäure gleiche Wirkung ausüben sollten? Diese Gleichheit beruht darauf, dass die hoch oxydierten Metallverbindungen einerseits durch die Gewebe, andererseits durch die nachträchliche Einwirkung das Haematoxylins selber zu den niedriger oxydierten, basischen Metallverbindungen reduziert werden. Das Kaliumbichromat wird z. B. von der Wolle in einer veränderten Form aufgenommen, nach

der Anschauung von Nietzki als chromsaures Chromoxyd. Bei allzu langem Aufenthalt in Kaliumbichromat färben sich Organstücke grün, ein Zeichen dafür, dass diese Reduktion noch weiter gegangen ist und zur Bildung eines einfachen Chromoxydsalzes geführt hat.

Das Haematoxylin ist ein leicht oxydierbarer Körper. Eine seiner Oxydationsstufen, das Haemateïn, ist bekannt. Aber, wie schon oben (p. 75) beschrieben ist, geht das Haematoxylin während seiner allmählichen Oxydation zahlreiche Farbenveränderungen ein, welche beweisen, dass es ausser dem Haemateïn noch eine grosse Reihe anderer Oxydationsprodukte giebt.

Wenn nun ein mit Chromsäure gebeiztes Gewebe in eine Haematoxylinlösung gebracht wird, so wirkt die unreduziert gebliebene Chromsäure als Oxydationsmittel auf das Haematoxylin, wird dabei zu basischem Chrom reduziert und bildet als solches Lacke mit dem noch vorhandenen Haematoxylin und dessen Oxydationsstufen.

In derselben Weise wirkt auch das Eisenchlorid (oder der Eisenoxydalaun) oxydierend auf das Haematoxylin, wird dabei zu Ferrosulfat reduziert und bildet als solches Lacke. Je nach der Anwesenheit der verschiedenen Oxydationsprodukte des Haematoxylins wird derselbe blauschwarz bis braunschwarz. Der schönste, zum Färben geeignetste Lack ist der blauschwarze, welcher aus nicht allzu ausgereiften wässerigen Haematoxylinlösungen entsteht.

Bei der Haematoxylinfärbung spielt die nachträgliche Differenzierung eine grosse Rolle. Die hierbei angewandten Methoden beruhen entweder auf der extrahierenden Wirkung der Säuren oder auf der Anwendung von Oxydationsmitteln, welche das Haematoxylin zu farblosen Verbindungen oxydieren, wie Ferricyankalium, Eisenchlorid (welches zufällig gleichzeitig als Beize verwandt wird; daher die „Differenzierung in der Beize"); Kaliumpermanganat.

### 6. Die indifferenten Farbstoffe.

Als indifferente Farbstoffe habe ich diejenigen Farbstoffe zusammengefasst, welche überhaupt keine salzbildende Gruppe besitzen. Es giebt verschiedene Arten solcher Farbstoffe:

1. kann man die reinen Chromogene, soweit sie als gefärbte Körper selbständig existenzfähig sind, hierhin rechnen, z. B. das Azobenzol. Andere Farbklassen als die Azofarbstoffe besitzen dagegen nur hypothetische gefärbte Chromogene, während ihre eigentlichen existenzfähigen Muttersubstanzen farblos sind. So ist z. B. das Thiodiphenylamin, ein farbloser Körper, als das Chromogen der Thiazine zu betrachten, jedoch nur in uneigentlichem Sinne, da die Thiazine nicht durch das blosse Anhängen von $NH_2$-Gruppen aus ihm entstehen.

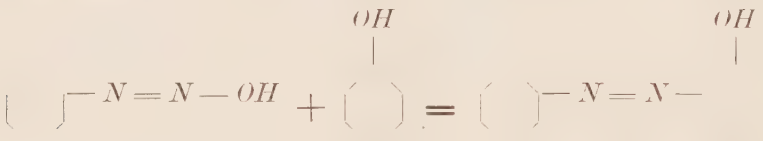
wie die Azofarbstoffe aus dem Azobenzol, sondern durch gleichzeitigen Austritt von 2 *H*-Atomen.

2. entsteht ein indifferenter Farbstoff durch das Hinzutreten einer indifferenten Gruppe, wie $-OCH_3$, $-OC_2H_5$ etc. zu einem Chromogen, z. B.

Aethoxyazobenzol.

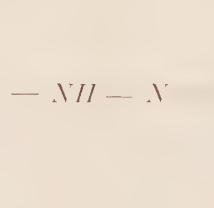
3. erleiden diejenigen Oxyazokörper, deren *OH*-Gruppe in Orthostellung zur Azogruppe steht, eine innere Atomumlagerung, welche sie zu indifferenten Körpern macht.

Bringt man z. B. Diazobenzol und p. Kresol in alkalischer Lösung zusammen, so tritt die Kuppelung der $N=N$-Gruppe nicht in der Parastelle zum *OH* des Kresol ein, weil diese besetzt ist, sondern in der Orthostelle:



Diazobenzol + p. Kresol = Benzolazo p. Kresol.

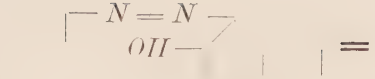
Dieser Körper lagert sich aber im Augenblick seines Entstehens aus seinen Komponenten in wässeriger Lösung vollständig in folgenden Körper um:



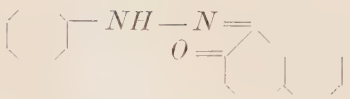
Das erkennt man daraus, dass der entstehende rote Farbstoff in Alkalien absolut unlöslich ist, was beim Vorhandensein einer *OH*-Gruppe nicht denkbar wäre. Ein zweiter Beweis für diese Auffassung liegt in der Thatsache, dass der aus Diazobenzol und Naphtol ententstehende Farbstoff identisch ist mit dem Condensationsprodukt von Phenylhydrazin und Naphtochinon und zwar sowohl der aus α Naphtol bezw. 1, 4 Naphtochinon, wie auch der aus β Naphtol, bezw. 1, 2 Naphtochinon, also z. B.:

aus β Naphtol

I.



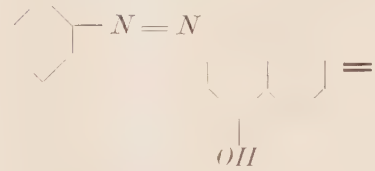
II.



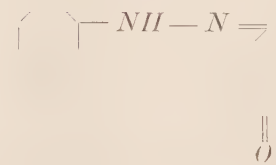
und

aus α Naphtol

I.



II.



Damit ist eine Tautomerie zwischen diesen beiden Körperreihen bewiesen. Welche der beiden Formeln jedesmal die richtige ist, ergiebt sich aus der Alkalilöslichkeit. Der Farbstoff aus α Naphtol ist alkalilöslich, entspricht also der Formel I, weil diese die *OH*-Gruppe enthält. Der Farbstoff aus β Naphtol ist alkaliunlöslich, entspricht also der Formel II, ist daher ein indifferenter Farbstoff.

Die in der Formel II enthaltene *NH*-Gruppe entfaltet nur gegen concentrierte $H_2SO_4$ basische Eigenschaften.

Alle diese indifferenten Farbstoffe haben die gleichen Löslichkeitsverhältnisse. Sie sind in Wasser völlig unlöslich, besser löslich in Alkohol, und vor allem in fetten Ölen, flüssigem oder geschmolzenem Paraffin, Chloroform, Benzol, Xylol etc.

Von allen diesen Körpern kommen nur die Fette im Organismus vor. Sie allein werden daher von den indifferenten Farbstoffen gefärbt, und zwar sowohl das eigentliche Fett, wie auch das Myelin und das Pigment der Ganglienzellen (Rosin).

### b) Die Farbstoffkombinationen.

#### 1. Die successive Färbung mit verschiedenen Farbstoffen.

Wenn man auf ein schon einmal gefärbtes Gewebe die Lösung eines zweiten Farbstoffes einwirken lässt, so sind verschiedene Möglichkeiten denkbar: entweder sind die beiden Farbstoffe ganz ohne Ein-

wirkung aufeinander, oder der zweite modifiziert die Färbung des ersten in irgend einer Weise, indem er mit ihm z. B. eine chemische Verbindung eingeht.

A. Die beiden Farbstoffe haben keine Wirkung auf einander. Dann ist wiederum denkbar

a) die beiden Farbstoffe haben Affinität zu verschiedenen Gewebselementen. Hierhin gehört die gewöhnliche Färbung mit Haematoxylin-Eosin. Das Haematoxylin kommt dabei als Alaun-Haemateïn-Lack zur Anwendung und färbt bei richtiger Anwendung fast nur die Kerne, während das Eosin die protoplasmatischen Substanzen färbt. Die beiden Farbstoffe lassen sich in beliebiger Reihenfolge unbehelligt von einander anwenden.

b) die Farbstoffe haben gleiche Affinitäten. Dann tritt eine Mischfärbung des Gewebselementes ein. Wenn man z. B. die Kerne mit einem Haemateïnlack vorfärbt und mit Safranin nach, so nehmen sie einfach einen violetten Mischton an.

B. Die beiden Farbstoffe wirken auf einander ein, und zwar

a) der erste Farbstoff ist eine Beize für den zweiten. In derselben Weise, wie man das Gewebe für einen beliebigen basischen Farbstoff mit Gerbsäure beizen kann, so kann man auch mit beliebigen sauren Farbstoffen beizen, vorausgesetzt, dass diese mit der Farbbase ein unlösliches Salz bilden. Wenn man ein oxyphiles Gewebe mit Pikrinsäure färbt und nachher der Wirkung von Methylenblau aussetzt, so entsteht unlösliches pikrinsaures Methylenblau, mit blaugrüner Farbe. Auf diese Weise lassen Gewebe, die an sich oxyphil sind, sich mit basischen Farbstoffen färben, und umgekehrt. So kommt die „Inversion“ von Rawitz zu stande. Eine erhebliche Bedeutung hat dieser Färbungsmodus in der Histologie nicht erlangt.

b) der zweite Farbstoff extrahiert den ersten, und zwar

α) entweder, indem er sich an die Stelle des ersten setzt: Substitutionsfärbung (Umfärbung). Wenn man mit Methylenblau gefärbtes Gewebe mit Bismarckbraun behandelt, so verwandelt sich die Färbung allmählich von blau bis braun. Die Schnelligkeit, mit der die Substitution vor sich geht, ist verschieden. Die M. Neisser'sche Doppelfärbung der Bakterien beruht darauf, dass die körnigen Einschlüsse der Bakterienleiber langsamer durch Bismarckbraun substituiert werden als die Bakterienleiber selbst (partielle Umfärbung (Unna)).

β) Der zweite Farbstoff extrahiert den ersten, ohne sich an dessen Stelle zu setzen.

Wenn man ein Blutpräparat mit Methylenblau färbt, so nehmen die Kerne sehr bald den Farbstoff an. Lässt man dann das Präparat in einer Eosinlösung liegen, so entfärben sich die Kerne allmählich vollkommen, ohne Eosin aufzunehmen. Diesen Vorgang hat man sich

so vorzustellen, dass das Methylenblau mit Eosin einen neutralen Farbstoff bildet, welcher aber nicht unlöslich ist — wie im obigen Falle —, sondern im Überschuss des Eosin so leicht gelöst wird, dass das Eosin das Methylenblau dem Kern entreisst. Eine derartige Reaktion tritt sehr häufig ein, wenn man mit einem basischen und einem sauren Farbstoff nach einander färbt oder umgekehrt, weil sehr häufig der entstehende neutrale Farbstoff in einem Überschuss des einen löslich ist, z. B. Toluidinblau-Eosin; Thionin-Eosin; Methylgrün-Säurefuchsin etc.

Diese Färbung kann man natürlich durch abgepasste Einwirkung des zweiten so einrichten, dass die Entfärbung nicht vollständig wird, sondern nur bis zu einem gewünschten Punkt fortschreitet.

## 2. Die Simultanfärbung mit Farbstoffgemischen.

Eine sehr wichtige Rolle spielen in der histologischen Technik die Farbstoffgemische. Wir müssen getrennt von einander betrachten die Gemische gleichartiger[1]) und die ungleichartiger Farbstoffe.

### α) Gemische chemisch gleichartiger Farbstoffe; Gemisch zweier saurer oder zweier basischer Farbstoffe.

Die Möglichkeit, dass sich verschiedene Gewebselemente in einem Gemisch zweier gleichartiger Farbstoffe nicht immer einfach in dem Mischton färben, sondern in verschiedener Weise den einen oder den anderen Farbstoff aus dem Gemisch bevorzugen, liegt daran, dass erstens die Affinitäten der einzelnen Gruppen gleichartiger Farbstoffe zu den verschiedenen Gewebselementen etwas verschieden sind, und zweitens, dass die einzelnen gleichartigen Farbstoffe eine verschiedene Färbekraft besitzen.

Die Färbekraft ist, wie schon früher gesagt wurde, gegenüber den gewöhnlichen, mit basischen oder sauren Farbstoffen färbbaren Gewebselementen um so grösser, je stärkere und mehr salzbildende Gruppen der Farbstoff besitzt, sei es nun, dass dadurch bei der injunktiven Färbung die chemische Affinität gesteigert wird, oder dass bei der insorptiven Färbung die Diffusibilität erhöht wird. Jedoch sind die Diffusibilität und Färbekraft nur bei der rein insorptiven Färbung einander wirklich proportional. Bei der injunktiven Färbung ist es sehr wohl möglich, dass die Färbung sehr langsam von statten geht, weil die Diffusion des Farbstoffs in die intermicellaren Räume nur langsam erfolgt, dass aber bei nur genügend langer Einwirkung die Färbung trotzdem eine grosse Intensität erreicht (Tuberkelbacillen mit Fuchsin).

[1]) Darunter ist in diesem Kapitel stets die Gleichartigkeit in Bezug auf Acidität oder Basicität gemeint.

Der andere Faktor ist die Verschiedenheit der Affinität der Gewebselemente zu den einzelnen chemisch gleichartigen Farbstoffen. Auf ihr beruht die elektive Färbung.

Wenn man mit einer 70 proz. alkoholischen Lösung von Scharlach R und Methylenblau färbt, so nehmen die Kerne das Blau, das Fett das Rot an. Trotzdem ist dies keine eigentliche elektive Färbung, denn derselbe Effekt wird erzielt, wenn man nach einander in beliebiger Reihenfolge mit Scharlach und Methylenblau färbt.

Anders aber, wenn man Lymphocyten mit einem Gemisch von Fuchsin und Methylenblau färbt. Einzeln angewandt, färbt jeder der beiden Farbstoffe sowohl Kern wie Protoplasma des Lymphocyten in seiner Farbe, in einem passenden Gemisch beider Farbstoffe färbt sich der Kern mit Methylenblau, das Protoplasma mit Fuchsin.

Ein nicht ganz so zutreffendes Beispiel bietet die elektive Färbung der Lymphocyten mit dem von Pappenheim empfohlenen Gemisch von Methylgrün und Pyronin. Methylgrün färbt an sich nur den Kern, Pyronin an sich aber Kern und Protoplasma. In einem Gemisch beider Farbstoffe färbt sich der Kern mit Methylgrün, das Protoplasma mit Pyronin. Es beschränkt also nur das Methylgrün die Pyroninfärbung, nicht aber, oder doch weniger, das Pyronin die Methylgrünfärbung.

Über die Ursache der Elektion kam Ehrlich zu folgenden Anschauungen.

Wenn man eine Anzahl von gleichen Blutpräparaten allmählich steigend, das erste bei 120°, das letzte bei 180° fixiert, so lassen sich in dem ersten die eosinophilen Granula mit allen sauren Farbstoffen färben, also z. B. von Nitrofarbstoffen sowohl mit der hellen Pikrinsäure wie mit der dunklen Aurantia. In den höher fixierten Präparaten verliert sich allmählich die Färbbarkeit mit Aurantia, während die mit Pikrinsäure noch erhalten bleibt. Oberhalb 180° fixierte Präparate sind auch mit Pikrinsäure nicht mehr färbbar. Das ist so zu deuten, dass mit dem abnehmenden Wassergehalt der höher fixierten Präparate eine Veränderung in dem Gefüge der Gewebselemente vor sich gegangen ist, welche das Eindringen der Farbstoffe erschwert; dass die Intermicellarräume kleiner geworden sind und zunächst nur noch den Farbstoffen mit kleinerem Molekül (Pikrinsäure) den Eintritt gestatten, nicht mehr den mit grösserem Molekül (Aurantia).

Die Diffusibilität der Farbstoffe steigt nämlich unter sonst gleichen Umständen mit abnehmender Molekulargrösse. Sie ist von noch sehr vielen anderen Umständen abhängig. So macht z. B. der Eintritt einer einzigen $SO_3H$-Gruppe ein an sich sehr grosses, schwer diffundierendes Molekül zu einem leicht diffundierenden. Die $SO_3H$-Gruppe ist gewissermassen ein Kiel, das dem Molekül das Eindringen zwischen die Moleküle des fremden Körpers erleichtert. Der

Zutritt einer *COOH* oder *OH*-Gruppe erhöht die Diffusibilität bei weitem nicht so stark. Aber unter Molekülen, welche in dieser Beziehung gleich gebaut sind, ist häufig das kleinere natürlich das beweglichere, leichter diffundierende. Bei Farbstoffen ist das kleinere, beweglichere Molekül oft identisch zu setzen mit dem helleren, das grössere mit dem dunkleren Farbstoff.

Umgekehrt, wenn bei gleicher Fixation zwei Gewebselemente eine Elektion zwischen zwei verschieden hellen Farbstoffen zeigen, so ist der Schluss berechtigt, dass das mit dem dunkleren Farbstoff sich färbende Gewebselement von vorn herein, bei gleicher Fixation, die grösseren Intermicellarräume, also das lockerere Gefüge hat.

Diese Lehre ist besonders von Pappenheim bis in die Einzelheiten genau durchgeführt. Ich möchte aber nicht unterlassen, auf einen Circulus vitiosus der Beweisführung aufmerksam zu machen, welcher mir die Sicherheit dieser ganzen Anschauung sehr herabzusetzen scheint.

Es heisst nämlich: weil die stärker fixierten, engporiger gewordenen Elemente nur die kleineren Farbstoffmoleküle eindringen lassen, welche gleichzeitig die helleren sind, muss man annehmen, dass bei Differenzen der Farbenaffinitäten bei gleicher Fixation diejenigen Elemente, welche den helleren Farbstoff bevorzugen, engporiger sind als die, die den dunkleren Farbstoff annehmen. Man nimmt hier als selbstverständlich an, dass „heller" und „kleinmolekularer" Farbstoff sich stets decken. Das ist aber durchaus nicht für alle Fälle zu beweisen. Man müsste danach nämlich annehmen, dass z. B. bei dem Fuchsin-Methylenblau-Gemisch das Fuchsin das kleinere Molekül hätte, bei Methylgrün-Pyronin das Pyronin.

Das hat etwas Willkürliches, Unbeweisbares an sich, und man wird deshalb gut thun, den Begriff der grossmolekularen und kleinmolekularen Farbstoffe besser aus dem Spiel zu lassen. Es genügt vollkommen, wenn wir von helleren und dunkleren Farbstoffen sprechen. Es ist ganz praktisch, den Begriff der Xanthophilie, Erythrophilie und Cyanophilie allein als Abstufungen der verschiedenen Basophilie oder Oxyphilie gelten zu lassen. Demnach giebt es innerhalb der basophilen und oxyphilen Elemente wiederum 1) xanthophile, 2) erythrophile, 3) cyanophile Elemente. Ein **basophiles und cyanophiles** Element wie der Kern, wird aus einem Gemisch der verschiedenartigen basischen Farbstoffe den blauen allen anderen bevorzugen. Aus einem Gemisch verschiedenfarbiger **saurer** Farbstoffe wird es den blauen, sauren Farbstoff bevorzugen. Aus einem Gemisch von sauren **und** basischen Farbstoffen wird es dagegen, unbekümmert um die Nuance, den basischen bevorzugen.

Um die Aufklärung dieser Verhältnisse hat sich vor allem Pappenheim ein grosses Verdienst erworben, indem es ihm gelungen ist, die Lehre von der Baso- und Oxyphilie (Ehrlich) zu verschmelzen mit der Lehre von der Cyano-, Erythro- und Xantophilie (Auerbach).

Es giebt nur wenige Gewebselemente, welche so ausgesprochene Basophilie besitzen, dass sie sich nicht auch etwas mit einem der Nuance nach adaequaten sauren Farbstoff färbten, und ebenso nur wenige Elemente von so absoluter Oxyphilie, dass sie sich nicht mit einem adaequaten basischen Farbstoff färbten. Absolut basophil sind die Mastzellengranula, absolut oxyphil die eosinophilen Granula.

So interessant nun aber auch die Resultate sind, welche man mitunter durch Kombination chemisch gleichartiger, verschieden gefärbter Farbstoffe findet, so kann ich doch nicht genug davor warnen, die Erwartungen an derartige Methoden zu hoch zu spannen.

Die hier gültigen Gesetze sind nur Annäherungsgesetze. Sie haben viele Ausnahmen. So färben sich z. B. die Gonokokken mit einem Methylgrün-Pyronin-Gemisch mit dem roten Pyronin (nach Pappenheim), mit einem Fuchsin-Thionin-Gemisch mit dem blauen Thionin (nach Lang). Die Mengenverhältnisse der beiden Farbstoffe zu einander spielen eine unberechenbare Rolle, und auch die Dauer der Einwirkung ist durchaus nicht zu unterschätzen. Bei einem Methylgrün-Pyronin-Gemisch begegnete es mir z. B. constant, dass bei sehr kurzer Färbedauer (2 Sekunden) die Kerne grün wurden; bei längerer Einwirkung (1—5 Minuten) wurden sie stets farblos oder rosa. Also äusserste Vorsicht bei Methoden, die auf Kombination zweier gleichartiger Farbstoffe beruhen!

### β) Gemische ungleichartiger Farbstoffe (basischer und saurer Farbstoffe): „neutrale Farbgemische".

Um sich über die färberische Wirkung des Gemisches eines basischen und sauren Farbstoffes, eines sog. „neutralen Farbgemisches", klar zu werden, ist es zunächst notwendig, sich von der üblichen Vorstellung frei zu machen, als sei ein „neutrales Farbgemisch" einfach identisch mit der Lösung eines einfachen neutralen Farbstoffes. Um sich von der Unrichtigkeit dieser Vorstellung zu überzeugen, muss man sich vergegenwärtigen, was bei der Herstellung eines neutralen Farbgemisches chemisch vor sich geht.

Bezeichnen wir im allgemeinen die Farbbase mit *Fb*, ihr Chlorid also mit *Fb Cl*, so sind nach den Anschauungen der theoretischen Chemie (Arrhenius) in wässeriger Lösung ausser dem Molekül *Fb Cl* noch die beiden durch elektrolytische Dissociation daraus entstandenen

Moleküle $Fb+$ und $Cl-$ vorhanden, wobei $Fb+$ das positiv geladene Jon $Fb$ und $Cl-$ das negativ geladene Jon $Cl$ bedeutet.

Bezeichnen wir die Farbsäure mit $Fs$, ihr Natronsalz mit $Fs\,Na$, so sind in der wässerigen Lösung des Natronsalzes ausser dem Molekül $Fs\,Na$ noch die beiden Moleküle $Fs-$ und $Na+$, als Jonen, enthalten.

Bringt man einen basischen und einen sauren Farbstoff in Lösung zusammen, so treffen also 6 Molekülgattungen aufeinander:

1) $Fb\,Cl$, 2) $Fb+$, 3) $Cl-$, 4) $Fs\,Na$, 5) $Fs-$, 6) $Na+$.

Dabei wird eine Umlagerung stattfinden, indem sich noch die beiden fehlenden Kombinationen bilden:

7) $Fb\,Fs$, 8) $Na\,Cl$.

Da $Fb\,Fs$ im Wasser schwer löslich ist, so fällt es aus; und weil damit das erstrebte Gleichgewicht wieder gestört ist, wird sich eine neue Portion $Fb\,Fs$ bilden, so lange, bis alles in irgend welcher Form vorhandene $Fb$ und $Fs$ nach Möglichkeit dazu verbraucht ist, um so viel $Fb\,Fs$ auszufällen, dass die nunmehr noch gebildete, geringe Menge $Fb\,Fs$ in Lösung bleiben kann. Mit anderen Worten: Der neutrale Farbstoff wird fast quantitativ ausgefällt. Setzt man nun einen weiteren Überschuss von $Fs\,Na$ hinzu, so geht nach den Angaben von Ehrlich der Niederschlag wieder in Lösung. Aus welcher Ursache nun auch immer diese Lösung eintreten mag, jedenfalls sind nach eingetretener Lösung des neutralen Farbstoffs wiederum die 8 Molekülgattungen $Fb\,Cl$, $Fb+$, $Cl-$, $Fs\,Na$, $Fs-$, $Na+$, $Fb\,Fs$, $Na\,Cl$, in Lösung vorhanden, wenn auch nicht alle in gleicher Menge, z. B. wird $Na\,Cl$ in sehr geringer Menge vorhanden sein, weil dieses Molekül erfahrungsgemäss in wässeriger Lösung sehr stark dissociiert ist.

Wenn man nun beobachtet, dass die Zellkerne sich in solchem neutralen Farbgemisch mit dem basischen Farbstoff allein färben, so kann das nicht als Beweis dafür angeführt werden, dass der Kern den neutralen Farbstoff spalte und die Farbbase allein an sich ziehe; denn das ist ja gar nicht nötig; in Lösung ist ja sowohl $Fb\,Cl$ wie $Fb+$ vorhanden. Mag der Kern zur Färbung $Fb\,Cl$ oder $Fb+$ bedürfen, beides findet er fertig in der Lösung.

Allerdings muss man dann auch eine andere, sehr gebräuchliche Anschauungsweise durchaus fallen lassen. Als Ursache dafür, dass die neutralen Farbstoffe im Überschuss des sauren wieder in Lösung gehen, wird gewöhnlich die Annahme der Bildung eines dreisäurigen Farbsalzes der Farbbase mit der Farbsäure angenommen; daher der Name „Triacid“. Also würde z. B. Methylgrün, welches eine dreisäurige Farbbase enthält, von denen für gewöhnlich nur zwei abgesättigt sind, nach dieser Auffassung mit einem Überschuss von Säurefuchsin das dreisäurige Salz $Fb\,(Fs)_3$ bilden. Nun ist es zwar

richtig, dass das Methylgrün im stande ist, dreisäurige Salze zu bilden, aber dies thut es nur mit concentrierten Mineralsäuren, $H_2SO_4$, $HNO_3$, $HCl$, dagegen schon nicht einmal mit Essigsäure. Und auch die dreisäurigen Salze mit Mineralsäuren sind nur bei einem grossen Überschuss der Mineralsäure existenzfähig. Beim blossen Verdünnen mit Wasser, mit Herabsetzung der Acidität des Lösungsmittels, zerfällt das dreisäurige Salz sofort wieder in das zweisäurige und freie Säure. Die meisten anderen dreisäurigen Farbsalze zerfallen beim Verdünnen sogar in das einsäurige Salz und 2 Moleküle freie Säure. Also zugegeben selbst, irgend eine Farbbase sei wirklich im stande, mit Methylgrün ein dreisäuriges Salz zu bilden, so müsste man dieses durch Verdünnen mit Wasser zerlegen können. Das ist aber nicht der Fall. „Triacid" färbt bei hundertfacher Verdünnung ebenso gut wie im concentrierten Zustand. Die färberischen Eigenschaften des „Triacid" können daher nicht auf der Gegenwart eines dreisäurigen Salzes des Methylgrüns beruhen.

Das ist aber auch von vorne herein gar nicht denkbar. Denn das Säurefuchsin wird nicht als freie Farbsäure, sondern als saures Natronsalz angewandt; ebenso das Orange G. Selbst wenn man den freien Farbsäuren die unwahrscheinliche Eigenschaft vindicieren wollte, mit Methylgrün dreisäurige Salze zu bilden, so ist dies für die sauren Salze derselben gewiss unmöglich. Auch das Spektroskop zeigt im concentrierten[1]) wie im verdünnten „Triacid" den um C gelegenen Absorptionsstreifen des zweisäurigen, gewöhnlichen Methylgrüns, welches dem dreisäurigen Methylgrün völlig abgeht.

Der Unterschied zwischen einem einfachen neutralen Farbstoff und einem neutralen Farbgemisch wird durch folgenden Versuch veranschaulicht. Wenn man einen Schnitt (z. B. durch die Niere) in der wässerigen Lösung des reinen eosinsauren Methylenblaus längere Zeit färbt, so nehmen sowohl die Kerne wie das Protoplasma den blauvioletten Ton des unzerlegten eosinsauren Methylenblaus an, der ziemlich schwer, nur durch Vergleichung, von dem Ton des reinen Methylenblau zu unterscheiden ist. Es hat sich das Gewebe diffus mit eosinsaurem Methylenblau insorptiv gefärbt. Das Protoplasma ist etwas violetter als die Kerne, woraus hervorgeht, dass das Protoplasma ausser dem unzerlegten eosinsauren Methylenblau auch etwas Eosinsäure injunktiv aufgenommen hat. Die roten Blutkörperchen dagegen färben sich allein im Ton des Eosin. Das ist deshalb möglich, weil das eosinsaure Methylenblau, wenn auch sicherlich nur in sehr geringem Grade, teilweise in die Jonen $Fb+$ und $Fs-$ dissociiert ist.

[1]) Um concentriertes Triacid zu spektroskopieren, muss man es in capillarer Schicht zwischen zwei Glasplatten ausbreiten.

Wenn man dagegen eosinsaures Methylenblau in Lösung mit etwas *Na Cl* versetzt, eine Weile stehen lässt und dann zur Färbung benutzt, so bekommt man ein ganz anderes Resultat. Es treffen nämlich dann in wässeriger Lösung zusammen *Fb*, *Fs*, *Na*, *Cl*; und aus diesen Bestandteilen werden sich folgende Molekülgattungen bilden:

1) *Fb Fs*, 2) *Na Cl*, 3) *Fb Cl*, 4) *Fs Na*, 5) *Fb* +, 6) *Fs* —,
7) *Na* +, 8) *Cl* —,

also dieselbe Zusammensetzung, als ob man gewöhnliches Methylenblau und Eosin in wässeriger Lösung zusammenbringt. In einer solchen kochsalzhaltigen Lösung von eosinsaurem Methylenblau färbt sich in der That das Protoplasma rein rot, die Kerne schwach, aber rein blau.

Also: Neutrale Farbgemische sind weder in chemischer Beziehung noch in ihrer färberischen Wirksamkeit identisch mit neutralen Farbstoffen. Das Wesentliche eines neutralen Farbgemisches ist also nicht die Anwesenheit eines neutralen Farbstoffes, sondern nur die gleichzeitige Anwesenheit von basischem und saurem Farbstoff. Wodurch man es erreicht, dass der basische und der saure Farbstoff neben einander in Lösung bleiben, ist ganz gleichgültig. Man kann es auf zwei Weisen erreichen:

1) Durch die von Ehrlich gefundene Methode, den anfänglich ausfallenden neutralen Farbstoff in einem Überschuss des einen, meist des sauren, Farbstoffs wieder in Lösung zu bringen,

2) dadurch, dass man nicht eine rein wässerige Lösung anwendet, sondern Alkohol, Aceton, Methylal und dgl. hinzufügt. Die Wirkung dieser Mittel hat man sich so vorzustellen: die schnelle Reaktion der basischen und sauren Farbstoffe gegen einander beruht darauf, dass die Dissociation in Jonen, auf welcher die Reaktion beruht, gerade in wässeriger Lösung am stärksten ist. Zusatz von etwas Alkohol drückt die Dissociation sehr stark herab. Wenn man daher Methylenblau und Eosin in halb-alkoholischer Lösung zusammenbringt, so bildet sich der Niederschlag von eosinsaurem Methylenblau nicht deshalb langsamer, weil der Zusatz von Alkohol den neutralen Farbstoff so gut in Lösung hielte, sondern deshalb, weil bei Gegenwart von Alkohol die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Methylenblau und Eosin stark verringert wird. Der Niederschlag entsteht langsamer, aber schliesslich entsteht er doch, ohne dass der Alkohol im stande wäre, ihn in erheblicherem Masse in Lösung zu halten. Durch den Einfluss des Alkohol, Aceton und dgl. wird also bewirkt, dass Methylenblau und Eosin eine Weile unverändert neben einander in Lösung sind.

Wie steht es dann aber mit der „Neutrophilie“ gewisser Gewebselemente? Unter Neutrophilie kann man nichts anderes verstehen, als die Verwandtschaft zu den neutralen Farbstoffen. Wären die

„neutrophilen" Granula in diesem Sinn neutrophil, so müsste man sie am besten mit einer reinen, wässerigen Lösung von eosinsaurem Methylenblau färben können. Das ist aber nicht der Fall. Dagegen lassen sie sich mit einigen Kombinationen von Methylenblau und Eosin (ich finde, entschieden am besten mit der von mir angegebenen mit Alkohol und Aceton) mit Leichtigkeit färben. Ich habe aber soeben auseinandergesetzt, dass diese Kombinationen weit davon entfernt sind, reine neutrale Farbstoffe darzustellen, im Gegenteil, sie enthielten Methylenblau und Eosin neben einander in Lösung, ohne dass die beiden Farbstoffe gegen einander reagierten. Wenn sich also die „neutrophilen" Granula nur mit „Triacid" oder gewissen ähnlichen Farbstoffkombinationen, nicht aber mit reinen neutralen Farbstoffen färben, so beweist das, dass sie eben nicht neutrophil sind. Auch ist der Farbenton, den diese Granula z. B. in „Triacid" annehmen, meist nicht verschieden von dem der eosinophilen Granula; wenn die neutrophilen violett werden, werden es gewöhnlich auch die eosinophilen; wenn die eosinophilen rot werden, werden auch die neutrophilen gewöhnlich rot. Der Ton hängt ganz vom Grade der Fixation ab. Der Unterschied in der Färbbarkeit der eosinophilen und neutrophilen Granula liegt nicht in der Nuance, sondern darin, dass die eosinophilen Granula sich unter allen Bedingungen mit sauren Farbstoffen färben, die neutrophilen aber nur dann, wenn der saure Farbstoff ihnen als Bestandteil einer „neutralen Farbmischung" angeboten wird. Die Ursache hierfür liegt darin, dass die gleichzeitig in Lösung vorhandenen Farbstoffe eine extrahierende Wirkung auf einander haben (vgl. später das Kapitel: Differenzierung) und dass diese sich gerade so gestaltet, dass das Protoplasma der multinucleären Leukocyten entfärbt wird (oder vielmehr farblos bleibt), während die Granula die Färbung annehmen.

Noch einmal also: die logische Konsequenz meiner Auffassung von der Zusammensetzung der „neutralen Farbgemische" ist die, dass die „neutrophilen" Granula keine Verwandtschaft zu den wirklichen neutralen Farbstoffen haben.

Auch in Methylenblau-Eosingemischen nehmen die „neutrophilen" Granula den reinen Eosin-Ton an. Mitunter gelingt es sogar, beim Nacheinanderfärben mit Eosin und Methylenblau die neutrophilen Granula darzustellen, ein Beweis für die Richtigkeit der Auffassung, dass das Wesentliche ein bestimmter Grad der Extraktion ist.

### c) Die Entfärbung.

Eine der gebräuchlichsten Methoden, um differenzierte Färbungen zu erhalten, ist die anfängliche Überfärbung und nachträgliche partielle

Entfärbung. In diesem Kapitel sollen die Methoden der Entfärbung besprochen werden.

Die Entfärbung beruht entweder auf einer chemischen Zerstörung des Farbstoffes oder auf der Extraktion.

Um eine Zerstörung des Farbstoffes handelt es sich z. B. bei der Weigert'schen Markscheidenfärbung. Der Chrom-Haemateïn-Lack wird durch ein Oxydationsmittel (Ferricyankalium; Kaliumpermanganat) in ein höheres, farbloses bezw. leicht gelb gefärbtes Oxydationsprodukt des Haematoxylins verwandelt. Ebenso wird bei der M. Heidenhain-schen Entfärbung des Eisenhaemateïnlackes durch Eisenoxydalaun der Haemateïnlack durch Oxydation entfärbt.

Viel häufiger kommt die Extraktion des Farbstoffes zur Anwendung. Dabei ist es nun theoretisch von Belang, ob man eine insorptive oder injunktive Färbung zu extrahieren hat. In derselben doppelten Weise, in welcher der Farbstoff an das Gewebe gebunden werden kann, kann er auch dem Gewebe entrissen werden, durch Anwendung eines blossen Lösungsmittels des Farbstoffes, durch **Exsorption,** und durch chemische Ausziehung, durch **Exjunktion.** Man glaube aber nicht, dass auf jeden Fall eine insorptive Färbung nur durch Exsorption, eine injunktive Färbung nur durch Exjunktion extrahiert werden könne. Es ist vielmehr möglich, dass eine Insorption, ebenso wie eine Injunktion, beide, sowohl durch Exsorption wie durch Exjunktion rückgängig gemacht werden kann.

Da die Insorption gleichsam durch Ausschütteln des Farbstoffes aus seiner wässerigen Lösung in das Gewebe stattgefunden hat, so wird man verstehen, dass durch ein noch kräftiger lösend wirkendes Mittel der Farbstoff wieder aus dem Gewebe ausgeschüttelt werden kann. So kann fast eine jede Kernfärbung zu einem Teil — soweit sie nämlich insorptiv ist — durch Alkohol, Aceton, Amylalkohol oder dergl. indifferente Lösungsmittel extrahiert werden.

Es ist aber auch denkbar, dass eine injunktive Färbung exsorbiert werden kann. Es giebt Analoga dafür, dass man Salze dadurch spalten kann, dass man ihnen die eine Komponente durch ein starkes Lösungsmittel entreisst. So kann man dem roten salzsauren Dimethylamidoazobenzol die Base durch Ausschütteln mit Chloroform oder fetten Ölen entreissen. Bei der Gewebsfärbung wird aber dieser Fall in praxi vielleicht nie eintreten, weil gerade diejenigen Farbsalze, welche so locker gebunden sind, dass sie sich auf diese Weise spalten lassen, naturgemäss keine Neigung zur injunktiven Färbung haben. Dass die gewöhnliche extrahierende Kraft des Alkohols gegenüber den Kernfärbungen nicht auf einer chemischen Spaltung beruht, kann durch

folgendes bewiesen werden. Ein injunktiv mit Fuchsin gefärbter Kern ist gleichsam ein Salz der Nucleinsäure mit der Rosanilinbase. Wenn der Alkohol diese Verbindung spalten wollte, müsste er also die Rosanilinbase aufnehmen. Diese ist aber farblos, und was der Alkohol aufnimmt, sind rote Farbstoffwolken. Mit anderen Worten: der Alkohol exsorbiert nur den insorbierten, aber nicht den injungierten Farbstoff.

Anders dagegen verhält sich die Exjunktion. Diese entfärbt in gleicher Weise insorbierte wie injungierte Färbungen. Z. B. kann eine insorptive Fuchsinfärbung dadurch rückgängig gemacht werden, dass man durch Behandeln mit *HCl* das gelbe, ungemein leicht lösliche dreisäurige Salz des Rosanilins bildet, welches wegen seiner hohen Löslichkeit ins Wasser diffundiert. Und eine injunktive Fuchsinfärbung kann man in gleicher Weise durch *HCl* entfärben, indem die Salzsäure die Rosanilinbase der mit dieser Base injungierten Gewebssäure entreisst.

Exjungierende Mittel für basische Farbstoffe sind, wie aus dem eben angeführten Beispiel ersichtlich ist, gleichgültig, ob die Färbung insorptiv oder injunktiv war, die Säuren.

Bei sauren Farbstoffen liegt es etwas anders, weil die mehrbasischen Salze der sauren Farbstoffe sich nicht so prinzipiell in ihrer Löslichkeit von den einbasischen unterscheiden, wie die mehrsäurigen Salze der polybasischen Farbstoffe von den einsäurigen. Durch verdünnte Säuren werden saure Farbstoffe nicht entfärbt, im Gegenteil, ein Teil von ihnen wird sogar durch Säuren „aviviert". Wir stossen hier auf einen Gegensatz unter den sauren Farbstoffen, denselben Gegensatz, der sich schon bei der Färbung mit sauren Farbstoffen bemerkbar machte. Ein Teil der sauren Farbstoffe färbt nämlich besser aus leicht angesäuertem Bade, weil hierdurch die Dissociation des Farbsalzes begünstigt wird; es handelt sich also um überwiegend injunktive Färbungen, um Bindung der Farbsäure an eine basische Gruppe des Gewebes. Dahin gehört z. B. Eosin, Säurefuchsin, Pikrinsäure etc.

Ein anderer Teil der sauren Farbstoffe färbt dagegen viel besser aus neutraler oder sogar leicht alkalischer Lösung; es sind dieselben Farbstoffe, die in der Technik als „Salzfarbstoffe" und direkte Baumwollfarbstoffe bekannt sind. Hierhin gehört das Congorot. Diese Färbungen werden durch nachträgliche Behandlung mit Säuren nicht wesentlich geändert, abgesehen davon, dass oft ein Farbenumschlag mit der Säurebehandlung verbunden ist, der durch nachherige Alkalisierung wieder rückgängig gemacht werden kann.

## 2. Das Verhalten der verschiedenen Gewebselemente zu den Farbstoffen.

### a) Die Färbung der Zellkerne.

Es giebt drei Methoden der Kernfärbung: 1. die Färbung mit beliebigen basischen Farbstoffen, 2. die Färbung mit dunklen, sauren Farbstoffen, 3. die Färbung mit Beizenfarbstoffen. Am universalsten ist die Färbung mit basischen Farbstoffen, man muss jedoch bei ihr berücksichtigen, dass bei Gegenfärbungen mit sauren Farbstoffen die Kernfärbung meist allmählich extrahiert wird. Die Färbung mit dunklen, sauren Farbstoffen hat kaum irgend welchen Vorzug, höchstens den, dass man beliebige andere hellere saure Farbstoffe als Gegenfärbung mit ihr kombinieren kann. Wo es sich um reine Kernfärbung handelt, ist und bleibt das Alaunhämatoxylin unübertrefflich. Je nach der Beschaffenheit der Farblösung tritt von vorn herein gleich eine isolierte Kernfärbung oder eine etwas diffusere Färbung ein. In letzterem Fall thut man gut, den überschüssigen Farbstoff durch Salzsäure zu extrahieren. Die Salzsäure muss aber nachträglich wieder sehr gut ausgewaschen werden. Das Wichtigste bei der Kernfärbung mit Hämatoxylin ist die nachträgliche Behandlung mit Alkalien. Durch diese gewinnt die Hämatoxylinfärbung erst den prachtvollen blauen Ton und ihre ausserordentliche Lichtbeständigkeit. Als Alkalien werden benutzt: Gewöhnliches Leitungswasser, welches infolge seines Gehalts an doppeltkohlensaurem Kalk genügend alkalisch ist, wenn man es nur lange genug einwirken lässt, oder ganz schwache Lösungen von Ammoniak oder Lithion carbonicum. Man hüte sich aber, zu viel Alkali zum Nachbehandeln zu verwenden, weil sonst die Gewebe leiden. Minimale Spuren von Alkalien genügen vollkommen. Die Hämatoxylinfärbung ist bei Luftabschluss so gut wie unbegrenzt haltbar. Stellen, die ganz am Rande des Deckglases liegen und mit der Luft etwas in Berührung kommen, bleichen nach Monaten aus. Man mache es sich daher zum Prinzip, mit Hämatoxylin gefärbte Schnitte immer so unter das Deckglas zu legen, dass dieses das Präparat überall mit einem weiten Rande überragt.

Wir kommen nun zu der Frage, ob die so charakteristische Färbung der Zellkerne mit den basischen Farbstoffen eine insorptive oder eine injunktive Färbung ist. Nach den oben auseinandergesetzten Grundsätzen ist es klar, dass derjenige Teil der Färbung, welcher durch blosse Behandlung mit reinem Alkohol extrahiert werden kann, nur insorptiv gebunden gewesen sein kann, dass dagegen der Teil der Färbung, welcher nur durch Säure extrahiert werden kann, mit grosser Wahrscheinlichkeit injunktiv gebunden ist. In praxi verhält es sich nun meistens so, dass bei sehr kurzer Einwirkung des Farbstoffes

durch blosse Einwirkung von Alkohol eine fast völlige Entfärbung erreicht werden kann. Es kann sich also hier nur um eine Insorption gehandelt haben. Wenn man aber basische Farbstoffe längere Zeit auf Zellkerne einwirken lässt, so zieht der Alkohol zunächst zwar auch noch Farbstoffwolken aus, aber ein gewisser Teil der Färbung widersteht jeder Extraktion durch reinen, säurefreien Alkohol. Mitunter kann man dann durch stärker Farbstoff-lösende Mittel, wie Amylalkohol, noch einen kleinen Teil des Farbstoffes extrahieren. Der Rest der Färbung ist aber nur durch Säure zu extrahieren. Der erste Teil der Färbung ist offenbar der insorptive, der zweite der injunktive. Bei Beginn der Farbstoffwirkung tritt also zunächst eine Insorption ein, welche erst allmählich und immer mehr in eine Injunktion umgewandelt wird. Das ist dasselbe Verhältnis, wie ich es bei der Färbung der Seidenfasern mit Fuchsin konstatieren konnte. Wenn man eine Seidenfaser in eine kalt gesättigte Lösung von Fuchsin nur sehr kurze Zeit einlegt, so färbt sie sich intensiv, aber ihre Färbung lässt sich so gut wie vollkommen durch blossen Alkohol wieder ausziehen. Wenn man aber die Seidenfaser mehrere Stunden der kalten Fuchsinlösung aussetzt oder wenn man sie in eine heisse Lösung von Fuchsin einlegt, so widersteht ein grosser Teil der jetzt erreichten Färbung vollkommen der Alkoholextraktion. Die anfängliche Insorption hat sich also in dem Masse, wie mehr Farbstoff in die intermolekularen Räume der Seidenfaser diffundiert ist, in eine Injunktion umgewandelt und die injunktive Färbung der Seide mit Fuchsin ist durch nichts zu unterscheiden von der roten Färbung, die die Seide in dem farblosen Bade der Rosanilinbase erhält, indem sie gewissermassen als Säure fungiert, und mit dieser Base ein Salz bildet. Diese Anschauungen lassen sich unmittelbar auf die Färbung der Zellkerne übertragen: zunächst Insorption, welche sich in verschiedenem Masse bei längerer Einwirkung des Farbstoffes in Injunktion umwandelt.

Ganz anders verhält es sich mit der Färbung der Kerne mit Beizenfarbstoffen. Der eigentliche Farbstoff ist hier nicht an irgend eine Substanz des Zellkernes gebunden, sondern an die Beize, das Metalloxyd, also bei der gewöhnlichen Hämatoxylinfärbung an das Aluminiumhydroxyd, und die Frage lautet daher, ob diese Metallbase durch Insorption oder durch Injunktion an den Zellkern gebunden sei. Es existiert zwar kein indifferentes Lösungsmittel, welches die Beize aus dem Gewebe extrahiert, nachdem sie dasselbe einmal damit imprägniert hat, aber schon in einem früheren Kapitel wurde gezeigt, dass diese Thatsache nicht als ein Beweis gegen die insorptive Natur des Festhaftens der Beize angeführt werden darf. Es ist mir aufs höchste wahrscheinlich, dass das Aluminiumhydroxyd in der That insorptiv im Gewebe gebunden ist.

Noch eine Kernfärbung müssen wir erwähnen, welche in letzter Zeit eine ganz hervorragende Rolle gespielt hat, indem es nämlich mit ihr gelungen ist, in vielen, bisher für kernlos gehaltenen einzelligen Organismen Gebilde nachzuweisen, welche die Autoren für Kerne ansprechen möchten, das ist die sogenannte Romanowski'sche Methode. Zur Geschichte dieser Methode sei folgendes mitgeteilt. Im Jahre 1893 beschrieb Romanowski zuerst eine Methode, mit Hilfe deren er innerhalb der bisher für strukturlos gehaltenen Malariaplasmodien feine körnchenartige Einschlüsse nachweisen konnte. Die Methode bestand darin, dass er eine wässerige Lösung von Methylenblau und Eosin zusammenbrachte und diese Mischung, unbekümmert um den dabei entstehenden Niederschlag, zur Färbung benutzte. Zunächst gerieth diese Methode wieder in Vergessenheit, weil sie sich als äusserst unzuverlässig erwies, bald gelang sie, bald schlug sie fehl, und erst viele Jahre später, 1898 wurde sie durch Ziemann eigentlich wieder entdeckt. Dieser Autor stellte zahlreiche, äusserst mühevolle Untersuchungen an, welche Bedingungen vorhanden sein müssten, damit diese eigenartige Farbreaktion gelänge, und er glaubte auch zu einem gewissen Resultat gekommen zu sein, aber es zeigte sich, dass seine Anschauungen über die Natur dieser Reaktion doch nicht vollständig waren. Aber ein Verdienst gebührt Ziemann doch, nämlich die Wichtigkeit dieser Reaktion im allgemeinen zur Darstellung der chromatinhaltigen Elemente, nicht nur bei den Malariaparasiten, sondern auch sonst bei einzelligen Organismen, wie bei Zellen höherer Tiere erkannt zu haben. Die theoretische Seite der Frage wurde erst durch Nocht weitergebracht: dieser wies nach, dass zum Zustandekommen der Romanowski'schen Färbung das Methylenblau eine bestimmte Veränderung erlitten haben muss, dieselbe Veränderung, welche Unna einstmals studiert hatte, und die er bei der Herstellung seines polychromen Methylenblaues künstlich hervorrief. Unna bezeichnete den Farbstoff, welcher, wie er es bezeichnete, durch „Reifung" aus dem Methylenblau entsteht, bald als Methylenrot, bald als Methylenviolett. Nocht mochte wohl erkannt haben, dass die Nomenklatur der Chemiker andere Farbstoffe als die von Unna gemeinten mit diesem Namen belegt hatte und bezeichnete deshalb dieses Umsetzungsprodukt, das Methylenblau, einfach als „Rot aus Methylenblau". Im Anschluss daran ist es mir gelungen, diesen Farbstoff mit demjenigen zu identifizieren, welchen Bernthsen, einer der vorzüglichsten Kenner der Methylenblaugruppe, als Methylenazur beschrieben hatte, wenn ich auch ausdrücklich hervorheben möchte, dass diejenige Formel, welche Bernthsen dem Methylenazur erteilt, sich nicht ganz mit den Eigenschaften dieses Farbstoffes vereinigen lässt. Nach seiner Beschreibung ist der von ihm als Methylenazur bezeichnete Farbstoff mit dem bei der Romanowski-

schen Reaktion in Frage kommenden Umsetzungsprodukt, das Methylenblau, mit absoluter Sicherheit identisch. Es handelt sich nämlich um einen durch Einwirkung von Alkalien aus dem Methylenblau entstehenden Farbstoff, welcher in Wasser ungemein leicht, noch leichter als das Methylenblau selbst mit blauer Farbe löslich ist und dessen rotbraune Farbbase durch Natronlauge mit Leichtigkeit aus dem Farbsalz in Freiheit gesetzt werden kann. In concentrierter Schwefelsäure löst sich der Farbstoff, wie das Methylenblau, mit grüner Farbe, eine Thatsache, welche den Farbstoff von allen anderen ähnlichen Umsetzungsprodukten von Methylenblau mit Sicherheit unterscheidet. Nun ist nach der Formel, welche im ersten Teil des Buches gemäss der Bernthsen'schen Auffassung das Methylenazur besitzt, dieser Farbstoff das Salz einer Ammoniumbase, ebenso wie das Methylenblau, und es ist deshalb nicht zu verstehen, weshalb im Gegensatz zum Methylenblau die Base des Methylenazur in alkalischer Lösung einen Farbenumschlag zeigt. Sie verhält sich darin genau so, als ob sie eine Aminbase aus der Klasse der Thiazine wäre, z. B. wie das Thionin oder das Toluidinblau, mit welchem sie auch sonst färberisch die grösste Ähnlichkeit hat, z. B. auch darin, dass ihre Salze Mastzellenkörnchen rot, Zellkerne blau färben. Nun kommt noch hinzu, dass man die Romanowski'sche Reaktion nicht nur durch dieses Methylenazur, sondern ebenso schön bei Anwendung ähnlicher Kombinationen von Eosin mit Thionin oder Toluidinblau erhalten kann, dagegen nicht mit reinem Methylenblau. Alle diese Thatsachen sprechen dafür, dass das Methylenazur eine Aminbase ist und daher die Bernthsen'sche Formel durchaus einer Nachprüfung bedarf.

Die Romanowski'sche Färbung wird nun in der Weise ausgeführt, dass man die Lösung eines dazu geeigneten Farbstoffes, also Methylenazur oder wohl auch Thionin- oder Toluidinblau mit einer wässerigen Lösung von Eosin versetzt und, unbekümmert um den entstehenden Niederschlag, die mit Alkohol fixierten Abstrichpräparate längere Zeit darin färbt. Die Methode gelingt bisher nur an Abstrichpräparaten, nicht an Schnitten und auch an Abstrichpräparaten fällt sie etwas ungleichmässig aus, nur diejenigen Kerne nehmen die typische leuchtend rote Farbe an, welche gut ausgebreitet sind. In Zellen, welche kugelig kontrahiert sind, fällt die Färbung mehr nach violett bis blau zu aus. Die lockereren Kerne geben die Reaktion leichter als die kompakteren pyknotischen, so z. B. gelingt sie ganz leicht bei den Kernen leukämischer Leukocyten, schwerer z. B. bei den Kernen der multinukleären Zellen des normalen Blutes.

Es fragt sich nun, wie das Zustandekommen dieser Reaktion der Farbstoffe chemisch zu erklären ist. Die erste Annahme ist, dass es sich um Färbung mit einem neutralen Farbstoffe, nämlich dem eosin-

sauren Methylenazur handle; die andere, dass sie auf einer eigentümlichen Metachromasie des Methylenazur beruhe. Auf die letzte Möglichkeit wurde ich dadurch gebracht, dass bei sehr langer Einwirkung die anfänglich blaue Kernfärbung mit eosinfreiem Methylenazur oder Toluidinblau in eine violette bis rote übergeht, während gleichzeitig die blaue Protoplasmafärbung der Lymphocyten in derselben Weise wie bei der ursprünglichen Romanowski'schen Methode rein blau blieb, ferner, weil die Farbe des eosinsauren Methylenazur mehr blauviolett ist, als die Chromatinfarbe. Dass die Färbung der Kerne nicht mit einem genau chemisch zu definierenden Farbstoff geschieht, sieht man auch daraus, dass je nach der Dichte der Chromatinsubstanz und je nach der Länge der Einwirkung der Farbenton mehr blau oder mehr rot wird. Zu allererst werden die Kerne auf jeden Fall blau und die Differenzierung der sich blau und der sich rot färbenden Elemente geschieht erst bei längerer Einwirkung der Farblösung. Möglicherweise geht die Färbung in der Weise von statten, dass sich zunächst alles mit dem blauen Methylenazur färbt und das Chromatin dann nachträglich das Eosin noch ausserdem aufnimmt. Das Methylenazur wäre also nach dieser Auffassung eine Beize für das Eosin. Wir können also vorläufig noch nicht entscheiden, ob die Romanowski-sche Rotreaktion der Kerne auf einer blossen Metachromasie des Methylenazur beruht, zu deren Entstehung die Gegenwart des Eosin nur den Anlass giebt; oder ob beide Farbstoffe, das Eosin und das Methylenazur, bei der Färbung aktiv betheiligt sind. Aber das eine können wir mit Sicherheit sagen, es handelt sich nicht etwa um eine Neutrophilie der Kernsubstanz, sondern, wenn überhaupt das Eosin aktiv betheiligt ist, dringt es nicht gleichzeitig mit dem Methylenazur in chemischer Bindung mit demselben in den Kern ein, sondern nach dem Methylenazur. Ziemann hat diese Reaktion als charakteristisches Reagens für Chromatinsubstanz hingestellt. Ich möchte aber ausdrücklich davor warnen, die Reaktion in diesem Sinne zu benutzen, z. B. färben sich die neutrophilen Granula nach der Methode rotviolett, welche gewiss keine Kernbestandteile sind und ausserdem ist es durchaus nicht als bewiesen hinzunehmen, dass die nach der Methode darstellbaren Körnchen der Malariaplasmodien und der Bakterien als Zellkerne zu betrachten seien. Eine grosse Reihe von derartigen Körnchen, die sich nach der Romanowski'schen Methode rot färben, lassen sich auch in vitalem Zustande mit Neutralrot, Methylenblau und Malachitgrün darstellen, was nach dem oben Auseinandergesetzten (p. 107) sehr stark gegen ihre Kernnatur spricht. Auch andere Granulationen, die man gewiss nicht für Kernderivate ansprechen wird, lassen sich gerade durch die Romanowski'sche Methode zur Anschauung bringen: gewisse Granula in Lymphocyten.

### b) Die Färbung der protoplasmatischen Substanzen.

Hierzu sind alle sauren Farbstoffe geeignet, jedoch haben auch die meisten basischen Farbstoffe die Fähigkeit, das Protoplasma zu färben. Im einzelnen bestehen einige Unterschiede im Verhalten der einzelnen sauren Farbstoffe gegenüber dem Gewebe, welche einer näheren Erklärung vorläufig nicht zugänglich sind. So färbt z. B. Eosin und die ihm verwandten Farbstoffe alle protoplasmatischen Elemente viel gleichförmiger als die meisten Sulfosäuren, z. B. Säurefuchsin, besonders in leicht angesäuertem Bade. Dieses differenziert die einzelnen protoplasmatischen Bestandteile viel schärfer, die Kittsubstanzen, die Strahlungen der Attraktionssphären etc. Die in das Protoplasma eingelagerten Körnchen verhalten sich sehr verschieden. Einige, wie die Zymogenkörnchen der Speicheldrüsen, färben sich mit Leichtigkeit in allen sauren Farbstoffen; andere werden bei den gewöhnlichen Konservierungsmethoden überhaupt nicht fixirt und sind nur durch complicierte Methoden, wie die Altmann'sche oder die Benda'sche zu erhalten. Sie färben sich dann mit complicierten Methoden, welche insofern für uns wenig Interesse haben, als durch die Eigenart der Fixation die Farbaffinitäten der Körnchen stark abgeändert werden. Das wesentliche abändernde Moment bei diesen Fixationen ist die Chromierung, deren Bedeutung für die Färbung wir bei der Besprechung der Beizenfarbstoffe kennen gelernt haben.

### c) Die Färbung des Fettes.

Vorbedingung für die Fettfärbung ist die Fixation in solchen Mitteln, welche das Fett nicht auflösen oder die Osmierung des Fettes, um dasselbe in den gewöhnlichen Fettlösungsmitteln unlöslich zu machen. Die Osmierung genügt an sich schon, um das Fett zu färben, sonst ist Formalin das geeignetste Fixierungsmittel, um das Fett unverändert zu erhalten. Eine Entwässerung ist dann nicht möglich, weil diese nur unter Zuhilfenahme von fettlösenden Mitteln geschehen kann. Trockenpräparate fixiert man am besten, indem man sie unter dem Exsiccator einige Minuten lang Formalindämpfen aussetzt. Fettfarbstoffe sind vor allen die indifferenten Farbstoffe, jedoch giebt es auch einige sehr schwach saure und basische Farbstoffe, welche aber so schwach basisch bezw. sauer sind, dass sie die übrigen Eigenschaften der basischen und sauren Farbstoffe nicht teilen. Zur Färbung eignet sich am besten eine gesättigte Lösung von Scharlach-R in 70 proc. Alkohol, welche das Fett intensiv rot färbt oder eine ebensolche Lösung von Indophenol, welche das Fett blau färbt. Die Präparate werden am besten in Laevulose, weniger gut in Glycerin

aufbewahrt; sie vertragen jede Gegenfärbung, nur muss man berücksichtigen, dass Hämatoxylinfärbungen in Levulose rasch abblassen.

### d) Die Färbung der Bindegewebssubstanzen.

Am besten eignen sich dazu noch die Sulfosäuren, wie Säurefuchsin, Wasserblau, wenn auch diese Methode keineswegs als eine spezifische gelten kann, eine solche steht noch völlig aus. Immerhin gelingt es mit Säurefuchsin, durch Kombination mit helleren sauren Farbstoffen in saurer Lösung einigermassen die Bindegewebsfaser hervorzuheben. Am gebräuchlichsten ist die Methode von van Gieson, welche in einer Simultanfärbung von Säurefuchsin und Pikrinsäure besteht, nach vorangegangener Hämatoxylinfärbung. Da die Pikrinsäure eine stark extrahierende Wirkung auf die Hämatoxylinfärbung ausübt, so muss man mit Hämatoxylin sehr stark überfärben. Der Chemismus der van Gieson'schen Färbung ist folgender: Die Pikrinsäure hat eine doppelte Funktion: 1. dient sie als Kontrastfarbe gegen das Säurefuchsin, 2. säuert sie die Lösung des Säurefuchsin an und erteilt ihr eine grössere Farbkräftigkeit. Bei etwaiger Ueberfärbung mit einer der beiden Bestandteile der van Gieson'schen Lösung lässt sich die überschüssige Pikrinsäure durch längeres Verweilen im Alkohol, das überschüssige Säurefuchsin durch abgepasstes Auswaschen in gewöhnlichem Leitungswasser, welches stets etwas alkalisch reagiert, entfernen. Fällt die Färbung im ganzen zu gelb aus, so kann die Fuchsinfärbung durch nachträgliche Behandlung mit sehr stark verdünnter Essigsäure „aviviert“ werden.

### e) Die Färbung der Kittsubstanzen, Kapillarwände, Zellmembranen etc.

geschieht am differentesten entweder mit Sulfosäuren, wie Säurefuchsin, oder mit Hämatoxylinfärbung nach vorangegangener Beizung mit Eisenoxydsalz und nachträglicher genau abgepasster Differenzierung. Es handelt sich auch hier nicht um irgend eine spezifische Färbung.

### f) Die Färbung der elastischen Fasern.

Die elastischen Fasern färben sich mit einer grossen Anzahl sowohl basischer, wie saurer Farbstoffe. So ist z. B. zu erwähnen, dass bei der subkutanen oder intravenösen Methylenblauinjektion, besonders in späteren Stadien der Färbung, statt der Färbung der Nervenfasern häufig eine schöne intensive Färbung der elastischen Fasern, besonders in der Herzmuskulatur eintritt, dass andererseits auch bei der vitalen Färbung mit Congorot die elastischen Fasern sich häufig bis in ihre feinsten Verzweigungen färben. Aber diese Methoden geben weder ein vollständiges Bild der elastischen Fasern.

noch sind sie zuverlässig genug. Sie sind jedenfalls keine spezifischen Färbungen. Ferner giebt es eine Reihe von Methoden, welche an fixierten Objekten die elastischen Fasern different färben. So sei erwähnt die von Lustgarten angegebene Färbung der elastischen Fasern mit „Victoriablau", dann mehrere Methoden von Herxheimer, welche aber alle nicht als spezifische Methoden gelten können und bei weitem übertroffen worden sind durch zwei neuere Methoden, die Orceinmethode von Unna und Taenzer und die Weigert'sche Methode. Diese Färbungen gehören zu den exaktesten und sichersten, die man sich denken kann; sie sind ebenso spezifisch, wie etwa die Fettfärbung mit einem indifferenten Farbstoff. Die Orceinmethode ist uns einer theoretischen Auseinandersetzung leider nicht zugänglich, weil die Konstitution des Orceins bisher völlig unbekannt ist. Es ist jedenfalls ein schwach saurer Farbstoff. Seine Anwendung muss für die Elastinfärbung auf jeden Fall aus ungesäuerter Lösung geschehen und zwar nach meinen Erfahrungen besser, sicherer und isolierter aus alkoholischer Lösung. Das Orcein färbt auch an sich das übrige Gewebe stark mit, nur leisten bei der nachherigen Differenzierung mit Salzsäurealkohol die elastischen Fasern einen viel grössern Widerstand, als das übrige Gewebe. Die allerschönsten und saubersten Resultate, eine vollkommen isolierte und gesättigte Färbung der elastischen Fasern erhält man, wenn man mit einer ganz stark, bis zur Durchsichtigkeit verdünnten Lösung von Orcein in einprozentigem Salzsäurealkohol 12 bis 24 Stunden färbt. Die andere Methode, diejenige von Weigert, beruht auf der Anwendung eines eigenthümlichen Farbstoffes, den Weigert zuerst dargestellt hat. Wenn man nämlich Fuchsin, Resorcin und Eisenchlorid in der Siedehitze auf einander einwirken lässt, so fällt ein in Wasser schwer löslicher Farbstoff aus, dessen Lösung in Salzsäurealkohol ein ausserordentlich intensiver, unübertrefflicher, spezifischer Elastinfarbstoff ist. Ueber die Konstitution dieses Farbstoffes ist garnichts bekannt; die Rolle, welche die drei Komponenten der Weigert'schen Lösung beim Zustandekommen dieses Farbstoffes spielen, ist durch Weigert und durch einige Versuche, welche ich nachträglich anstellte, einigermassen aufgeklärt worden. Das Fuchsin ist durch sehr viele andere basische Farbstoffe ersetzbar, so durch Thionin, Oxonin, Phenosafranin, Dimethylsafranin, Methylviolett und viele andere. Nicht geeignet ist unter anderem das Methylenblau. Aber nicht nur basische Farbstoffe sind dazu geeignet, sondern auch andere, ungefärbte aromatische Basen wie Anilin, Paratoluidin, Dimethylanilin; höchst wahrscheinlich sind es aber nicht diese Basen selbst, welche mit den andern Körpern die Reaktion geben, sondern gewisse indulinartige Farbstoffe, welche beim Behandeln dieser Basen mit dem angewandten Eisenchlorid

entstehen. Das Eisenchlorid spielt allein die Rolle eines Oxydationsmittel, jedenfalls ist der Eisengehalt ganz ohne Bedeutung. Man kann es z. B. durch Ammoniumpersulfat ersetzen. Die dritte Componente, das Resorcin, kann durch Phenol, Orcin, Pyrogallol, Orthokresol, nicht aber durch Parakresol ersetzt werden; es sind nur Phenole, keine Amine brauchbar. Es kann nicht schwer sein, unter den zahlreichen darstellbaren Elastinfarbstoffen einige zu finden, welche der chemischen Analyse zugänglich sind und es wäre theoretisch von äusserstem Interesse, die Constitution dieser sonderbaren Farbstoffklasse aufzuklären. Leider stehen rein chemische Untersuchungen noch ganz aus.

Was nun die praktische Seite dieser Färbungen anbetrifft, so ist am geeignetsten der von Weigert selbst angegebene Farbstoff aus Fuchsin, Resorcin und Eisenchlorid. Nächstdem möchte ich zwei andere Farbstoffe empfehlen, den aus Thionin, Resorcin, Eisenchlorid und den aus Dimethylsafranin, Resorcin und Eisenchlorid. Die Weigert'schen Farbstoffe verhalten sich dem Gewebe gegenüber wie basische Farbstoffe, also anders als das Orcein. Der Farbenton der elastischen Fasern schwankt bei der Weigert'schen Färbung zwischen rotviolett und blauschwarz. Besonders wenn die Färbung mehr rot ausfällt, kann ich die nachträgliche Behandlung des Schnittes mit salpetriger Säure empfehlen. Sie trägt einerseits zur Differenzierung bei, andererseits verwandelt sie den Farbenton der elastischen Fasern in einen gesättigt grauschwarzen. Die salpetrige Säure wird bereitet, indem man eine 1 ‰ Lösung von Natriumnitrit mit einigen Tropfen Salzsäure versetzt. Ihre Wirkung beruht offenbar auf der Diazotierung.

### g) Die Färbung der Bakterien.

Alle Bakterien färben sich mit basischen Farbstoffen. Gegen Hämatoxylinlacke verhalten sie sich verschieden, jedenfalls unterscheiden sich die Bakterien dadurch von den Zellkernen, dass sie sich durchweg viel sicherer und leichter mit basischen Farbstoffen als mit Beizenfarbstoffen färben. Saure Farbstoffe nehmen sie im allgemeinen nur schwer an, jedoch kann man nicht prinzipiell sagen, dass die Bakterien sich überhaupt mit sauren Farbstoffen nicht färben. Manche, besonders wie es scheint, dunkle saure Farbstoffe, färben die Bakterien ganz gut: Säurefuchsin, viel schlechter Eosin. Die Schnelligkeit, mit der sich die Bakterienleiber färben, ist bei den einzelnen Arten verschieden. Man kann im allgemeinen zwei Arten von Bakterienprotoplasma unterscheiden, die einigermaassen scharf von einander zu trennen sind, das leicht färbbare und das schwer färbbare Bakterienplasma. Von den schwer färbbaren Bakterien war das erste bekannte und heute noch das wichtigste der Tuberkelbacillus. Ihm schliessen sich die Sporen der Bakterien an, welche um so schwerer färbbar

sind, je älter und reifer sie sind. Die Ursache für die schwere Färbbarkeit liegt offenbar daran, dass die Diffusion der Farbstoffe in dies Protoplasma sehr langsam von statten geht. Als Ursache für die geringe Permeabilität pflegte man erst eine Hülle, dann einen vorhandenen fett- oder wachsartigen Körper des Bakterienleibes anzunehmen, nachdem man das Wachs der Tuberkelbacillenkultur kennen gelernt hat. Das ist aber nach den Untersuchungen von Helbig keineswegs richtig, denn erstens produzieren auch andere Bakterien, welche sich sehr leicht färben, in reichlicher Menge Fette und andererseits wird die Färbbarkeit des Tuberkelbacillus durch völlige Entfettung nicht erhöht. Wie Helbig festgestellt hat, ist vielmehr die schwere Färbbarkeit der Ausdruck einer ganz bestimmten chemischen Beschaffenheit des Bakterienleibes. Es verhalten sich nämlich alle diejenigen Substanzen in derselben Weise gegen Farbstoffe wie die Tuberkelbacillen, welche aus chitinähnlichen Körpern und ich möchte noch hinzufügen, keratinähnlichen Substanzen bestehen, also Flügel von Insekten, Schalen von Bandwurmeiern, Haare, Epidermis, Wollfasern, Borsten von Pinseln etc.

Alle schwer färbbaren Substanzen sind auch schwer entfärbbar. Welche Methode der Entfärbung man auch anwenden mag, sei es die Substitutionsfärbung, welche Robert Koch ganz zuerst zum Nachweis der Tuberkelbacillen benutzte (lang dauernde Vorfärbung mit Methylenblau, partielle Substitutionsfärbung mit Bismarkbraun) oder Entfärbung durch Säure und besonders durch säurehaltigen Alkohol. Bei der Entfärbung der Tuberkelbacillen ist beachtenswert, dass die Säure selbst in den Tuberkelbacillus eindringt, sodass z. B. ein mit Fuchsin rot gefärbter Tuberkelbacillus bei der Behandlung mit Salpetersäure gelb wird. Während aber aus allen übrigen Substanzen dieses gelbe triacide Salz das Fuchsin leicht herausdiffundiert, diffundiert aus dem Tuberkelbacillus nur wieder die überschüssige Säure heraus. Der Farbstoff selbst setzt der Extraktion einen ungeheuren Widerstand entgegen.

Bezüglich der Frage, ob die gewöhnliche Bakterienfärbung mit basischen Farbstoffen eine insorptive oder eine injunktive Färbung ist, bestehen dieselben Verhältnisse wie bei den Zellkernen. Aller Farbstoff, welcher nach langem Auswaschen in Alkohol an den Bakterienleib gebunden bleibt, muss als insorptiv gebunden angenommen werden. Hier ist es auch Zeit, die Gram'sche Färbung zu besprechen. Sie beruht darauf, dass die Bakterien mit Methylviolett oder einem andern, diesem nahestehenden Farbstoff gefärbt und dann der Einwirkung von Jod unterworfen werden. Die so behandelten Bakterien verhalten sich dem Alkohol gegenüber auf zwei verschiedene Weisen; entweder entfärben sie sich ungemein leicht oder sie entfärben sich gar nicht. Ein Mittelding scheint bei wachstumsfähigen, wohl aus-

gebildeten Bakterien nicht vorzukommen, wohl aber hin und wieder bei degenerierten Bakterien. Wie soll man sich die Einwirkung des Jod erklären? Unna hat ausführliche Untersuchungen darüber angestellt und glaubte gefunden zu haben, dass zur Gram'schen Färbung sich nur diejenigen Farbstoffe eignen, welche sich vom Rosanilin, nicht aber die, welche sich vom Pararosanilin ableiten. Es ist eigentlich schwer verständlich wie eine an einer so indifferenten Stelle des Moleküls sitzende Methylgruppe, wie die beim Rosanilin, einen Einfluss auf eine derartige Reaktion haben könnte, und es bedarf auch deshalb der Untersuchung, ob man nicht doch violette Farbstoffe auch der Rosanilinreihe findet, die sich zur Gram'schen Färbung eignen und rote Farbstoffe aus der Pararosanilinreihe, welche sich nicht dazu eignen (Parafuchsin!); denn seit Unna's Untersuchungen haben sich die Methoden, um Farbstoffe der Triphenylmethanreihe darzustellen, ausserordentlich vermehrt; jedenfalls eignen sich nur violette Farbstoffe für die Reaktion. Die Wirkung des Jod ist jedenfalls nicht so zu erklären, dass sich einfach das Jodid des Farbstoffes bildet, denn dann müsste die Reaktion ebenso gut bei der Anwendung von reinem Jodkali ohne überschüssiges Jod eintreten. Auch hier würde sich das Jodid des Farbstoffes bilden, aber zur Gram'schen Färbung bedarf es freien Jods. Da nun das Jod die Eigenschaft hat, mit vielen aromatischen Basen lockere, additionelle Verbindungen zu bilden, so wird man nicht fehl gehen, auch die Wirkung des Jods bei der Gram'schen Färbung auf diese Weise zu erklären. Damit ist allerdings für das Zustandekommen der nachträglichen Entfärbungsmöglichkeit oder Entfärbungsunmöglichkeit nichts gewonnen und es verlohnt nicht, sich über das Wesen der Gram'schen Färbung ein Urteil zu bilden, bevor nicht in dem oben angedeuteten Sinne ausführliche Untersuchungen vorgenommen worden sind. Nur das eine kann man sagen, diejenigen Bakterien, welche sich nach Gram entfärben, müssen den Farbstoff nach der Einwirkung des Jod insorptiv, die nicht entfärbbaren injunktiv enthalten.

Ebenso, wie es schwer und leicht färbbares Bakterienprotoplasma giebt, giebt es auch innerhalb eines Bakteriums Differenzen in der Färbbarkeit der verschiedenen plasmatischen Bestandteile, welche zwar nicht so ausgeprägt sind wie jene, aber immerhin genügend, um Doppelfärbungen zu erzielen. Das sind die körnigen Einschlüsse der Bakterienleiber, welche man nach ihren ersten Beobachtern als Ernst-Babés'sche Körper zu bezeichnen pflegt. Die Differenz der Färbbarkeit dieser Körnchen tritt hervor, wenn man die in toto mit irgend welchen basischen Farbstoffen gefärbten Bakterienleiber einer Differenzierung durch Substitutionsfärbung unterwirft; dabei geben die Ernst-Babes'schen Körperchen den Farbstoff langsamer ab als das übrige Bakterien-

protoplasma. Marx und Woithe behaupten zwar, dass die Unterschiede in der Färbbarkeit zwischen den beiden Substanzen der Bakterienleiber prinzipielle seien, sie sind aber sicherlich nur gradueller Natur, denn sobald man die Substitutionsfärbung nur etwas länger einwirken lässt, werden auch die Ernst-Babés'schen Körperchen entfärbt. In praxi färbt man auch zu diesem Zweck gewöhnlich zuerst mit Methylenblau und substituiert dieses durch Bismarkbraun. Es genügt vollkommen, wässerige Lösungen dieser Farbstoffe anzuwenden, etwas andere Rezepte, welche sich durch Zusatz von Essigsäure zum Methylenblau unterscheiden, sind von M. Neisser und anderen angegeben worden, jedoch ist das wenigstens für das Wesen der Sache ohne Belang.

### h) Die Färbung der Axencylinder der Nerven.

Eine eigentliche spezifische Färbung der Axencylinder am fixierten Objekt giebt es nicht, denn die Schwärzungen der Axencylinder, welche auf ihrem Reduktionsvermögen gegenüber einigen Metallsalzen beruhen, sind nicht als eigentliche Färbung zu bezeichnen und die Färbung der Nervenfasern mit Methylenblau ist keine Färbung am fixierten, sondern am vitalen Objekt und in dem betreffenden Kapitel abgehandelt worden. Bezüglich des Reduktionsvermögens der Axencylinder ist noch der interessanten Thatsache zu gedenken, dass es sich nicht um eine allgemein reduzierende Eigenschaft gegenüber irgend welcher reduzierbaren Substanz handelt, sondern um eine streng spezifische, reduzierende Kraft, welche sich nur gegen ganz gewisse Metallsalze, gegen die des Silbers, des Goldes und Quecksilbers richtet, während eine so leicht reducierbare Substanz wie die Osmiumsäure gerade vom Axencylinder des Nerven nicht reduziert wird.

### i) Färbung der Markscheiden.

Die Markscheidenfärbungen sind alle dem von Weigert eingeführten Prinzip der Hämatoxylinlackfärbung und nachträglicher Differenzierung nachgebildet und es dürfte zum Verständnis aller dieser Färbungen genügen, wenn ich eine und zwar die ursprünglich Weigert'sche Methode in ihren Einzelheiten bespreche. Die Methode beginnt mit einer Behandlung der Gewebe mit Kaliumbichromat oder Chromsäure. Die Chromsäure spielt eine doppelte Rolle, erstens fixiert sie die Substanz der Markscheiden, indem sie sie ihrer Löslichkeit in Alkohol beraubt, zweitens beizt sie dieselbe für die nachträgliche Färbung mit Hämatoxylin. Die Weigert'sche Färbung gelingt nämlich ohne nachherige Beizung mit Kupferacetat auch und es giebt einige Modifikationen, z. B. die von Kulschitzki, welche die

zweite Beizung mit Kupfer ganz fortlassen, ein Beweis, dass die nachträgliche Behandlung mit Kupfersalz jedenfalls von untergeordneter Bedeutung ist. Sie ist nichts weiter, als eine nochmalige Beizung, sodass sich bei der nachfolgenden Behandlung mit Hämatoxylin nun nicht allein der Chromlack bildet, sondern auch noch der Kupferlack. Das nachfolgende Hämatoxylin wird nun von der in dem Gewebe haftenden Chromsäure zu Hämateïn oxydiert, die Chromsäure dabei zu basischem Chromsalz reduziert und dieses bezw. das gleichzeitig vorhandene Kupfer bildet mit dem Hämateïn den die Markscheiden färbenden Lack. Die Weigert'sche Färbung ist regressiv. Es wird zunächst alles überfärbt und nachher teilweise entfärbt, dabei zeigt sich, dass der Farbstoff am längsten in den Markscheiden haften bleibt, wohl weil er in grösster Menge in ihm aufgespeichert wird. Die Entfärbung bei der Weigert'schen Methode beruht ausschliesslich auf einer Oxydation: diese geschieht z. B. durch mit Borax alkalisch gemachtes Ferricyankalium oder bei der Pal'schen Modifikation durch Permanganat.

### k) Färbung der Neuroglia.

Weigert hat eine Methode zur elektiven Färbung der Neuroglia angegeben, welche er auch zur isolierten Färbung der Gallengangskapillaren, der anisotropen Substanz der Muskelfasern etc. verwendet. Eine irgendwie annehmbare chemische Erklärung für diese Methode zu geben, ist bis jetzt nicht möglich, obwohl unzweifelhaft die Sicherheit der Methode gewinnen würde, wenn man den Sinn einer jeden der mannigfaltigen Prozeduren, die bei der Methode in Anwendung kommen, verstände. Das Gewebe wird bei der Weigert'schen Methode mit Metallsalzen gebeizt und dann mit einem basischen Farbstoff, dem Methylviolett, gefärbt. Diese Methodik ist durchaus neu und chemisch bis jetzt nicht recht zu erklären. Mit Metallsalzen beizte man sonst immer, wenn man mit einem sauren Farbstoff, besonders den eigentlichen Beizenfarbstoffen, welche durchweg Farbsäuren sind, färben wollte. In welcher Weise durch Metallbeizung die Färbung mit basischen Farbstoffen beeinflusst wird, ist noch nicht systematisch untersucht worden.

Die Beize ist ein Gemisch von Kupfersulfat und Chromalaun. Chrombeizen wurden in der Histologie immer nur in Form der hochoxydierten Chromverbindungen benutzt, in denen das Chrom als Säure auftritt: Kaliumbichromat, Chromsäure. Im Chromalaun (Kalium-Chromisulfat) ist das Chrom aber als basischer Bestandteil enthalten.

Zwischen die Beizung und die eigentliche Färbung schaltet Weigert noch eine „Reduktion" durch Kaliumpermanganat und hinterher durch Chromogen (Dioxynaphthalindisulfosäure) und schweflige

Säure ein. Wie Kaliumpermanganat reduzierend wirken kann, ist nicht recht ersichtlich. Chromogen und schweflige Säure sind allerdings Reduktionsmittel. Die eigentliche Färbung besteht dann in der ebenfalls von Weigert angegebenen Fibrinfärbung, deren Wesen auch noch völlig unklar ist. Ebenso scheinen mir die von Benda angegebenen Beizenfärbungen für Neuroglia etc. einer strengen chemischen Erklärung noch nicht zugänglich.

# Historischer Überblick über die Entwickelung der Farbstoffchemie.

Der erste, welcher einen Farbstoff als das Produkt einer trockenen Destillation erhielt, war v. Reichenbach (1832). Er gewann aus Holztheer den Pittakall, dessen Identität mit einem von v. Liebermann später gefundenen Farbstoff, der Eupittonsäure (Hexamethyloxyaurin) wahrscheinlich ist.

Die Farbstoffchemie beginnt aber eigentlich erst mit den Arbeiten von Mitscherlich, A. W. Hofmann, Zinin, Fritzsche u. a., welche die Konstitution der einfachen Benzolderivate aufklärten. Der erste technisch verwertete künstliche Farbstoff war das „Mauvein" (Perkin 1856). Fast gleichzeitig fand Nathanson das Rosanilin. 1858 erhielt A. W. Hofmann durch Einwirkung von Anilin auf Kohlenstofftetrachlorid einen roten Farbstoff, ebenfalls das Rosanilin (Fuchsin). 1859 wurde von Renard frères und Franc das erste Patent auf eine Darstellungsweise des Fuchsin genommen. Somit hatten sich die Anilinfarbstoffe die Technik erobert. A. W. Hofmann entdeckte den Zusammenhang vieler Derivate des Rosanilins. Die Untersuchungen von Martius und Griess führten zur Kenntnis der ersten Azofarbstoffe. Graebe und Liebermann stellten 1869 zuerst das Alizarin künstlich dar. 1874 gelangten die von Baeyer gefundenen Phthaleine (Eosin) zur Verwendung.

1876 entdeckten E. u. O. Fischer das Pararosanilin und klärten seine Konstitution auf.

1876 entdeckte Lauth das Thionin, 1877 Caro das Methylenblau; O. N. Witt und Roussin gaben durch neue Synthesen den Azofarbstoffen ihre ungeahnte Verbreitung. 1879 stellte Nietzki den ersten Tetrazofarbstoff dar. 1880 führte Baeyer die Synthese des Indigo aus. 1881 entdeckte Witt die Indophenole, ferner das Neutralrot etc.

Die allgemeine Theorie vom Bau der Farbstoffe, die Einführung der Begriffe: Chromophor, Chromogen, die Unterscheidung von gefärbtem Stoff und Farbstoff etc. stammt von O. N. Witt.

Von demselben rührt auch diejenige Theorie des Färbeprozesses her, welche den Begriff der „starren Lösung" zur Erklärung desselben heranzieht.

Die Einführung der Färbemethode in die histologische Technik fand zu einer Zeit statt, wo die künstlichen Anilinfarbstoffe noch nicht entdeckt oder doch gerade erst in den allerersten Anfängen bekannt waren. Gerlach verwendete 1857 zuerst ausgiebig das Carmin zu histologischen Zwecken, nachdem vorher schon F. Cohn und Göppert (1843) es für botanische Zwecke verwandt hatten und Hartig (1857) die Färbung mit diesem Farbstoff eingehend studiert hatte. 1863 machte Waldeyer den Versuch, den Blauholzextrakt histologisch zu verwerten, und 1865 gelang es Böhmer, die erste wirklich brauchbare Haematoxylinmischung herzustellen. Die wissenschaftliche Durchforschung dieses Gebiets, die eigentliche Begründung einer rationellen Methodik knüpft sich an zwei Namen: Ehrlich und Weigert. War es letzterem gelungen, durch Einführung z. B. des Methylviolett zur Bakterienfärbung, sowie durch eine Ausbeutung der Methode der Beizenfärbungen, oft rein empirisch, oft in Anlehnung an die Technik der industriellen Färber zu ungeahnten Resultaten zu kommen, so ist Ehrlich es, der auf rein wissenschaftlich-chemischer Grundlage es verstanden hat, das scheinbar so fern von der Medizin abliegende Gebiet der Farbstoffchemie zu einer unentbehrlichen Hilfswissenschaft der Medizin, ja der gesamten Biologie zu machen. Von grundlegenden Arbeiten stammt von Ehrlich an rein methodologischen Beiträgen: die Erkenntnis von den färberischen Verschiedenheiten der basischen und sauren Farbstoffe; der Begriff und die Verwertung der neutralen Farbstoffe; der Begriff der elektiven Färbung; die vitale Färbung zur Messung der Reduktionskraft der Gewebe; die vitale Färbung der Nervenelemente mit Methylenblau; die vitale Färbung vieler Körnchen mit Neutralrot etc. etc.

Durch diese Arbeiten war eine Grundlage geschaffen, deren weiterer Ausbau eigentlich recht langsam von statten gegangen ist. Trotz der Untersuchungen vieler Forscher, wie Gierke, Auerbach, P. Mayer, Griesbach, und vor allem Unna, dann M. Heidenhain, Rosin u. a. fand die theoretische Seite der Farbstoffchemie im allgemeinen wenig Anklang, und die rohe Empirie machte sich gerade auf diesem Gebiete breit. Erst vor einem Jahre ist die erste zusammenhängende Farbstoffchemie für histologische Zwecke von Pappenheim erschienen.

# Register.


Acridin 66.
Acridinrot 53.
Aethoxyazobenzol 126.
Alizarin 69.
Alizarinblau 71, 97.
Alizaringrün 71.
Alizarinrot 69.
Alkaliblau 60.
Amidogruppe 14.
Ammoniumbase 15.
Anilinblau 60.
Anthragallol 70.
Aurantia 28.
Aurin 62.
Axencylinder 150.
Azin 2, 46.
Azobenzol 9, 28, 125.
Azogruppe 2.
Azoniumbase 49.

Bakterienfärbung 147.
Bathochrom 12.
Bayrischblau 62.
Beizenfärbung 89, 124.
Benzaurin 55.
Benzhydrol 52.
Benzidin 9, 36.
Benzol 4.
Berlinerblau 2.
Bindegewebe 145.
Bindschedler's Grün 2, 40.
Bismarckbraun 33, 105.
Brillantdiazinblau 99, 104.
Brillantkresylblau 46, 97.

Carboxyl 14.
Carmin 76, 124.
Carminrot 76.
Carminsäure 76.
Chinolin 66.
Chinon 6.
Chinondiimid 39.
Chinonoxim 10, 67.
Chromalaun 151.
Chromogen 13, 16.
Chromophor 2.
Chrysoidin 33.
Cochenille 76.
Congorot 37, 103.
Cumarin 74.
Cyanin 66.
Cyanophilie 131.

Dahlia 58, 117.
Diamidosafranin 50.
Diazingrün 51, 99, 104.
Diazogruppe 2.
Diazotierung 29, 147.
Dihydrobenzol 6.
Dimethylamidoazobenzol 31, 32, 115.
Diphenylmethan 52.
Direkte Färbung 100.
Dissociation 88.

Echtheit 24.
Eigenfarbe 1.
Elastinfärbung 145.
Elektion 130.
Entwicklungsfärbung 92.
Eosin 64, 123.
Erythrosin 65.
Erythrophilie 130.
Eurhodin 47.
Eurhodol 47.
Exjunktion 113, 137.
Exsorption 113, 137.

Farbbase 16.
Farbsäure 16.
Farbphenol 23.
Fettponceau 36.
Flavanilin 66.
Flavon 74.
Fluoran 65.
Fluoresceïn 25, 64.
Fluorescenz 25, 96.
Fuchsin 56.

Gentianaviolett 58.
Gerbsäure 18.
Gram'sche Färbung 149.

Haemateïn 75.
Haematoxylin 74, 124.
Hydrazo 19.
Hydrocyklische Verbindungen 5.
Hydroxyl 14.
Hypsochrom 12.

Janusgrün 52, 99.
Imido 14.
Indamin 39.
Indifferente Farbstoffe 18, 125.
Indigo 72.
Indigoweiss 73.

Indigpurpurin 73.
Indigrot 73.
Indirekte Färbung 100.
Indophenol 39, 97.
Indoxyl 72.
Indulin 50.
Injunktion 87.
Insorption 87.
Inversion 128.
Jodgrün 60.
Jodviolett 60.
Ionen 133.
Isopurpurin 70.

Kernfärbung 139.
Kittsubstanz 145.
Kresylviolett 46.
Krapp 69.
Kristallviolett 58.
Küpenfärbung 139.

Leukokörper 19.
Laevulose 43.
Leukomethylenblau 43.

Malachitgrün 54.
Markscheiden 150.
Mauveïn 50.
Metachromasie 116.
Methylenazur 43, 141.
Methylenblau 42, 95, 99, 123.
Methylenrot 44.
Methylenviolett 44.
Methylgrün 59, 108.
Methylviolett 58.

Naphthazarin 68.
Naphthol 35.
Neuroglia 151.
Neutrale Farbgemische 132.
Neutrale Farbstoffe 18, 121.
Neutralrot 26, 40, 47.
Nigrosin 51.
Nitro 2, 14.
Nitroso 2, 10.

Orange 35.
Orthochinon 7.
Oxazin 46.
Oxazon 46.
Oxyazobenzol 8, 34.
Oxyketon 74.

Parachinon 7.
Parafuchsin 56.
Pararosanilin 55.
Pararosolsäure 62.
Phenazin 9.
Phenetol 31.
Phenolphthaleïn 63.
Phenylenbraun 33.
Phthaleïne 63.
Pikrinsäure 28.
Protoplasma 144.
Purpurin 53.

Reduktion 19.
Reduktionskraft 93.
Reduktionswiderstand 95.
Resorufin 46.
Rosamin 55.
Rosanilin 56.
Rosanilindisulfosäure 57.
Rosolsäure 62.
Ruberythrinsäure 69.

Safranin 49.
Safraninazofarbstoffe 51.
Säurefuchsin 57.
Scharlach 36.
Schwebefällung 85.
Starre Lösung 83.
Substitutionsfärbung 128.
Sudan 36.
Sulfanilsäure 29.
Sulfosäuren 14.

Tautomerie 9.
Tetramethylamidoanthrachinon 115.
Tetrazo 35.
Thiazin 41.
Thiazon 45.
Thiodiphenylamin 13.
Thionin 41.
Thionol 44, 45.
Thionolin 45.
Tinten 91.
Toluidinblau 42.
Tolusafranin 50.
Toluylenblau 40.
Toluylenrot 47.
Triacid 133.
Triamidoazobenzol 33.
Triphenylmethan 53.
Tropaeolin 33, 34.
Tuberkelbazillen 147.
Türkischrot 69.

Umfärbung 64.
Uranin 128.

Verküpung 19.
Vesuvin 33.
Vitale Färbung 93.

Wasserblau 62.

Xanthon 74.
Xanthophilie 131.

Zellkerne 139.
Zinkstaub 20

3.H.89.
Einfuhrung in die Farbstoffchem1902
Countway Library
BDZ5370
3 2044 045 609 005

3.H.89.
Einfuhrung in die Farbstoffchem1902
Countway Library BDZ5370
3 2044 045 609 005